

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MELISE CRISTINE LECHETA

EFEITOS DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO DE *Sarconesia chlorogaster* (WIEDEMANN, 1830) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) E SUA POSSÍVEL UTILIZAÇÃO NA ENTOMOLOGIA FORENSE

CURITIBA

2012

MELISE CRISTINE LECHETA

EFEITOS DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO DE *Sarconesia chlorogaster* (WIEDEMANN, 1830) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) E SUA POSSÍVEL UTILIZAÇÃO NA ENTOMOLOGIA FORENSE

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Osvaldo Moura

Co-orientadora: Prof. Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen

CURITIBA

2012


MELISE CRISTINE LECHETA

“EFEITOS DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO DE *Sarconesia chlorogaster* (WIEDEMANN, 1830) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) E SUA POSSÍVEL UTILIZAÇÃO NA ENTOMOLOGIA FORENSE”

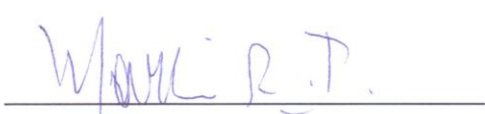
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Mauricio Osvaldo Moura (Orientador)
(UFPR)



Prof. Dr. Cláudio José Von Zuben
(UNESP/RC)



Prof. Dr. Márcio Roberto Pie
(UFPR)

Curitiba, 27 de fevereiro de 2012.

*“Quem me acompanha que me
acompanhe: a caminhada é longa, é
sofrida mas é vivida. Porque agora
te falo a sério: não estou brincando
com palavras. Encarno-me nas
frases voluptuosas e ininteligíveis
que se enovelam para além das
palavras. E um silêncio se evola sutil
do entrechoque das frases.”*

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Mauricio Osvaldo Moura, pela orientação, oportunidade, suporte e paciência, e também pelas conversas, acadêmicas ou não.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa.

À Prof. Dra Patrícia Jacqueline Thyssen pela disponibilidade e auxílio na criação e biologia.

À Dra Paula Aparecida Federiche Borges Bassi e ao Prof. Dr. Márcio Pie, pela imensa ajuda na utilização de equipamentos em horários “alternativos”.

Ao pessoal da forense: Karine Vairo, Kleber Makoto Mise, Maria Fernanda Caneparo e Rodrigo César Corrêa, pela parceria e discussões.

Aos colegas da Unicamp Daniel Brancoli, Fabio Rezende e Maicon Grella por sempre estarem dispostos a esclarecer dúvidas sobre criação, e por terem acabado com o mistério de como preparar a dieta das moscas.

Aos colegas do Laboratório de Dinâmicas Ecológicas, pelo convívio, risadas, conversas e por deixarem a rotina do laboratório muito mais divertida.

Aos colegas de mestrado e às amizades construídas durante esse período: Débora Rebechi, Lígia Barizon, Daiara Manfio, André César, Fernando Leivas, Daniel Moura, Frederico Kirst, Selene Cirio Leite e Rafael Cedro Sandoval.

Aos meus pais, Nelson Martins Lecheta e Sonia Souza Lecheta por sempre acreditarem em mim, pelo apoio, amor e por serem meus exemplos de vida.

Ao meu namorado David Richard da Luz, pelo companheirismo, carinho e amor, e também por ter se mostrado um ótimo “padrasto de moscas”, cuidando da minha criação quando eu precisei.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO GERAL

Uma das principais aplicações da Entomologia Forense médico-legal é a estimativa do intervalo pós-morte (IPM), ou seja, o tempo decorrido desde a morte até o encontro de um cadáver. O pressuposto dessa estimativa é que, ao calcular a idade de desenvolvimento dos insetos encontrados em um corpo, seja possível calcular o tempo de colonização baseado em populações de insetos, e assim obter o IPM. Os dados de desenvolvimento dos insetos utilizados na área forense estão relacionados ao tempo de desenvolvimento dos estágios imaturos em diferentes temperaturas, bem como dados de crescimento baseados no peso e comprimento das larvas. Os Calliphoridae (Diptera) são um dos primeiros grupos de organismos a colonizar um corpo, sendo, portanto, considerados de interesse forense. Para a região sul do Brasil, *Sarconesia chlorogaster* tem grande potencial de ser utilizada em estimativas de IPM pela distribuição restrita e hábitos necrófagos. Assim, esse estudo teve como objetivo geral determinar o tempo de desenvolvimento, as exigências térmicas das formas imaturas e modelar o crescimento usando o peso e comprimento das larvas de *S. chlorogaster*. Os experimentos foram realizados em câmaras climáticas com temperaturas controladas em 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de 60%, utilizando dieta artificial para o desenvolvimento das larvas. A temperatura afetou significativamente o tempo de desenvolvimento total de ovo a adulto de *S. chlorogaster* (Deviance=12,436, $\chi^2 < 0,001$, gl=4), que variou de 98,7 dias em 10°C a 15 dias em 30°C. De forma geral, *S. chlorogaster* aumentou seu tempo de desenvolvimento conforme a diminuição da temperatura. A temperatura também afetou significativamente a viabilidade das pupas de *S. chlorogaster* ($F_{5,24}=43,862$, $P < 0,001$), sendo que em 35°C houve mortalidade de 100% das pupas. A partir da regressão linear das taxas de desenvolvimento nas seis temperaturas estudadas, verificou-se que a temperatura base para o desenvolvimento desta espécie é 6,33°C e a constante térmica (K) total de 355,51 graus-dia. De maneira geral quanto maior a temperatura, mais rápido foi o ganho de peso e comprimento das larvas de *S. chlorogaster* e a análise de modelos de crescimento indicou que o modelo de Weibull é o que melhor representa o crescimento de *Sarconesia chlorogaster*.

Palavras-chave: Calliphoridae; IPM; entomologia médico-legal; biologia.

ABSTRACT

One of the main applications of medico-legal forensic entomology is the estimation of postmortem interval (PMI), *i.e.*, the time elapsed from death to find a corpse. The assumption of this estimate is that when calculating the age of development of insects found in a body, it is possible to calculate the time of colonization based on insect populations, and thus obtain the PMI. The data used in the development of forensic insects are related to the development time of immature stages at different temperatures, as well as growth data based on weight and length of the larvae. The Calliphoridae (Diptera) are one of the first groups of organisms to colonize a body and is therefore considered of forensic interest. To the south of Brazil, *Sarconesia chlorogaster* has great potential to be used in PMI estimates because the restricted distribution and necrophagous habits. Thus, this study aimed to determine the overall development time, the thermal requirements of the immature stages and the growth model, using the weight and length of larvae of *S. chlorogaster*. The experiments were performed in chambers with controlled temperature at 10, 15, 20, 25, 30 and 35°C, photoperiod of 12 hours and relative humidity of 60%, using artificial diet for the larvae development. The temperature significantly affected the total development time from egg to adult of *S. chlorogaster* (Deviance=12.436, $\chi^2 < 0.001$, df=4), which ranged from 98.7 days at 10°C to 15 days at 30°C. In general, *S. chlorogaster* increased development time as the temperature decreases. Temperature also significantly affected the viability of the pupae of *S. chlorogaster* ($F_{5,24}=43.862$, $P < 0.001$), whereas at 35°C was 100% mortality of the pupae. From the linear regression of development rates in the six temperatures studied, it was found that the minimum development threshold of this specie is 6.33°C and overall thermal constant (K) of 355.51 degree-days. In general the higher the temperature the faster was the weight and length gain of the larvae of *S. chlorogaster* and analysis of growth models indicated that the Weibull model is the one that best represents the growth of *Sarconesia chlorogaster*.

Keywords: Calliphoridae; PMI; medicolegal entomology; biology.

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	12
 Capítulo I. O efeito da temperatura no tempo de desenvolvimento e determinação das exigências térmicas dos estágios imaturos de <i>Sarconesia chlorogaster</i> (Diptera, Calliphoridae)	22
1 Introdução	23
2 Objetivos	25
3 Material e Métodos.....	26
3.1 Obtenção e manutenção dos exemplares para estudo	26
3.2 Criação em laboratório	26
3.3 Parâmetros biológicos.....	27
3.4 Determinação da constante térmica, temperatura base e taxa de desenvolvimento	28
3.5 Análises.....	30
4 Resultados	31
5 Discussão.....	37
5.1 Desenho experimental e exigências térmicas	37
5.2 Tempo de desenvolvimento das formas imaturas de <i>S. chlorogaster</i>	39
5.3 Modelo de dias-acumulados (GDA), temperatura base e limiar máximo de desenvolvimento e suas implicações para a estimativa do IPM.....	42
6 Referências Bibliográficas	44
 Capítulo II. O efeito da temperatura em características biométricas das larvas de <i>Sarconesia chlorogaster</i> (Diptera, Calliphoridae)	49
1 Introdução	50
2 Objetivos	52
3 Material e Métodos.....	53
3.1 Parâmetros biológicos.....	53
3.2 Análises.....	54
4 Resultados	56
4.1 Peso	56
4.2 Comprimento.....	61

5 Discussão.....	68
5.1 Utilização das medidas de peso e comprimento das larvas nas estimativas de intervalo pós-morte	68
5.2 Peso e comprimento das larvas durante o desenvolvimento	70
6 Referências Bibliográficas	73
Conclusões	77

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I.

- Figura 1. Velocidade de desenvolvimento ($\frac{1}{D}$) e duração (em horas) do tempo de desenvolvimento de *Sarconesia chlorogaster*, estimados a partir de temperaturas constantes de 10°C a 30°C para o período de incubação (a), primeiro ínstar (b) e segundo ínstar (c). A linha da duração do desenvolvimento corresponde a uma curva ajustada por polinômio e as linhas pontilhadas correspondem ao intervalo de confiança do modelo ajustado35
- Figura 2. Velocidade de desenvolvimento ($\frac{1}{D}$) e duração (em horas) do tempo de desenvolvimento de *Sarconesia chlorogaster*, estimados a partir de temperaturas constantes de 10°C a 30°C para o terceiro ínstar (a), período de pupa (b) e período de ovo a adulto (c). A linha da duração do desenvolvimento corresponde a uma curva ajustada por polinômio e as linhas pontilhadas correspondem ao intervalo de confiança do modelo ajustado.....36

Capítulo II.

- Figura 1. Eixo de medição do comprimento da larva de *S. chlorogaster*, baseado em Day & Wallman (2006)54
- Figura 2. Ganho de peso (em gramas) nos três ínstares larvais de *Sarconesia chlorogaster*, criados a temperaturas entre 10°C e 35°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas.....57
- Figura 3. Curvas de crescimento do peso (g) das larvas de *Sarconesia chlorogaster* durante o desenvolvimento nas temperaturas de 10°C (a), 15°C (b) e 20°C (c), baseadas no modelo de crescimento de Weibull59
- Figura 4. Curvas de crescimento do peso (g) das larvas de *Sarconesia chlorogaster* durante o desenvolvimento nas temperaturas de 25°C (a), 30°C (b) e 35°C (c), baseadas no modelo de crescimento de Weibull60

Figura 5. Média do peso (g) das larvas de <i>Sarconesia chlorogaster</i> durante o desenvolvimento em temperaturas de 10°C a 35°C.....	61
Figura 6. Ganho no comprimento (em milímetros) nos três ínstares larvais de <i>Sarconesia chlorogaster</i> , criados a temperaturas entre 10°C e 35°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas.....	63
Figura 7. Curvas de crescimento do comprimento (mm) das larvas de <i>Sarconesia chlorogaster</i> durante o desenvolvimento nas temperaturas de 10°C (a), 15°C (b) e 20°C (c), baseadas no modelo de crescimento de Weibull	65
Figura 8. Curvas de crescimento do comprimento (mm) das larvas de <i>Sarconesia chlorogaster</i> durante o desenvolvimento nas temperaturas de 25°C (a), 30°C (b) e 35°C (c), baseadas no modelo de crescimento de Weibull	66
Figura 9. Média do comprimento (mm) das larvas de <i>Sarconesia chlorogaster</i> durante o desenvolvimento em temperaturas de 10°C a 35°C.....	67

LISTA DE TABELAS

Capítulo I.

- Tabela 1. Viabilidade das pupas de *Sarconesia chlorogaster* criadas a temperaturas de 10°C a 35°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas. As letras representam os resultados do teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo que temperaturas sem diferença estatística na mortalidade são representadas pelas mesmas letras.....31
- Tabela 2. Média de tempo de desenvolvimento (M) em horas, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para os estágios imaturos e para o período total de ovo a adulto de *Sarconesia chlorogaster*, criados a temperaturas entre 10°C e 35°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas. As letras representam os resultados do teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo que temperaturas sem diferença estatística na média do tempo de desenvolvimento são representadas pelas mesmas letras32
- Tabela 3. Temperatura base (T_b), constante térmica (K) e equações da velocidade de desenvolvimento para cada estágio imaturo e para o período total de ovo a adulto de *Sarconesia chlorogaster*, criados às temperaturas de 10°C a 30°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas.....34

Capítulo II.

- Tabela 1. Média de peso (M) em gramas, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para os três ínstares larvais de *Sarconesia chlorogaster*, criados a temperaturas entre 10°C e 35°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas. As letras representam os resultados do teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo que temperaturas sem diferença estatística na média de peso são representadas pelas mesmas letras.....57
- Tabela 2. Média de comprimento (M) em milímetros, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para os três ínstares larvais de *Sarconesia chlorogaster*, criados a temperaturas entre 10°C e 35°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas. As letras representam os resultados do teste de

Tukey ($P < 0,05$), sendo que temperaturas sem diferença estatística na média de comprimento são representadas pelas mesmas letras.....62

INTRODUÇÃO GERAL

Entomologia Forense e a estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM)

Entomologia Forense é o nome dado ao campo de estudo em que os insetos e outros artrópodes são utilizados em procedimentos legais (Hall 2001). Lord & Stevenson (1986) propuseram dividi-la em três subáreas: (a) urbana, (b) de produtos armazenados e (c) médico-legal, a última associada principalmente à investigação de insetos e outros artrópodes recuperados em corpos e cenas de crimes (Benecke 2001).

Centenas de espécies de artrópodes são atraídas por matéria orgânica em decomposição, especialmente moscas (Diptera) e besouros (Coleoptera), embora também sejam encontrados ácaros, isópodes, opiliões e nematóides (Catts & Haskell 1990; Benecke 2001). Estes animais se alimentam, vivem e se reproduzem nas carcaças, dependendo de suas preferências biológicas e da fase de decomposição da carcaça (Méglin 1894; Deonier 1940) e isso abre um vasto leque de aplicações para a área forense. Porém, uma das principais aplicações diz respeito a estimativa do intervalo pós-morte (IPM), ou seja, o tempo decorrido desde a morte até o encontro de um cadáver (Greenberg 1991).

A decomposição de um corpo é um processo contínuo e alguns dos vários processos naturais associados à decomposição, tais como o *rigor* e o *livor mortis*, podem ser utilizados para estimar o IPM (Campobasso *et al.* 2001). Normalmente, esses processos são, tradicionalmente, os mais usados para este fim, embora nestes casos o IPM e a acurácia de sua estimativa sejam inversamente proporcionais, isto é, quanto maior o IPM, menos acurada é a sua determinação. Neste sentido, o método entomológico pode ser muito útil, sobretudo com um tempo de morte superior a 72 horas (Catts & Haskell 1990) chegando até quase o limite de três meses (Goff & Odom 1987).

O pressuposto por trás das estimativas feitas a partir de dados entomológicos é que, ao calcular a idade de desenvolvimento dos insetos em um corpo, seja possível calcular o tempo de colonização, e assim obter o IPM (Catts 1992). Essa estimativa é chamada de IPM mínimo, pois estima há quanto tempo o corpo foi exposto à colonização de insetos, já que a morte pode ter ocorrido em um tempo variável antes da colonização (Amendt *et al.* 2007). Como as moscas da família Calliphoridae estão entre os primeiros grupos de organismos a colonizar um corpo, o

foco das estimativas de IPM mínimo muitas vezes está associado a estes indivíduos (Catts 1992; Catts & Goff 1992).

Os dados de desenvolvimento dos insetos utilizados na área forense estão relacionados à duração do desenvolvimento dos estágios imaturos em diferentes temperaturas, bem como dados de crescimento com base no peso e comprimento das larvas. A idade dos insetos coletados em cadáveres é calculada mais frequentemente quando estes se encontram nas fases larvais, embora também possam ser feitos para ovos e pupas.

Assim como outros invertebrados, os insetos são categorizados como ectotérmicos, e, portanto apresentam um desenvolvimento, em maior ou menor escala, dependente das condições ambientais. A temperatura é uma peça chave no comportamento, ecologia e valor adaptativo dos insetos (Huey 2010) por influenciar todos os aspectos da fisiologia destes organismos (Cossins & Bowler 1987; Chown & Nicolson 2004; Angilletta 2009). Apesar da influência da temperatura sobre a taxa metabólica ser um dos fatos mais bem confirmados na fisiologia de insetos e muitas das modificações nas taxas metabólicas pela temperatura já serem conhecidas nesses organismos, muitos estudos continuam a documentá-las (Chow & Nicolson 2004).

Temperaturas extremamente baixas ou extremamente altas são prejudiciais ou até mesmo letais, mas mesmo as temperaturas entre esses limites críticos têm efeitos profundos no desenvolvimento e crescimento dos insetos (Huey 2010). Temperaturas mais altas geralmente aumentam as taxas de crescimento e diminuem o tempo de desenvolvimento (Atkinson 1994; Atkinson & Sibly 1997) e isso tem consequências fisiológicas para a alimentação, crescimento e reprodução. Sendo assim, não é de se estranhar que a mudança na temperatura também promova variações na duração, peso e comprimento das larvas durante o desenvolvimento.

A taxa de desenvolvimento de um inseto, quando regida pela temperatura, é diferente entre as espécies, mesmo para aquelas intimamente relacionadas (Richards *et al.* 2009). Então, identificar com precisão as espécies encontradas em um cadáver, reconstruir as temperaturas da cena do crime e obter dados de desenvolvimento dos insetos imaturos encontrados em um cadáver, é essencial para permitir que um entomologista forense calcule a idade de um inseto amostrado (Amendt *et al.* 2011).

Também é importante lembrar que, mesmo com a mais rigorosa análise da evidência, qualquer processo biológico geralmente envolve uma grande parte de “ruído” como uma consequência de vários fatores complicadores. Assim, a obtenção do IPM mínimo é essencialmente uma estimativa e a quantidade de variação em torno dessa estimativa irá aumentar quanto maior for o período de tempo decorrido desde que uma pessoa foi morta (Gunn 2006).

Tendo em vista a existência de três metodologias para calcular o IPM mínimo – o modelo de graus-dia acumulado (GDA), peso e comprimento das larvas –, nesta dissertação, dados de desenvolvimento da espécie *Sarconesia chlorogaster* (Diptera, Calliphoridae) foram obtidos em diferentes temperaturas para permitir que seja feita uma estimativa do IPM utilizando estas três metodologias.

***Sarconesia chlorogaster* (Wied.)**

A espécie *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann, 1830) pertence à família Calliphoridae, subfamília Toxotarsinae. Essa subfamília é endêmica da região Neotropical e sua distribuição geográfica ocorre entre 4°S e 40°S, em regiões de clima frio e em altitudes que variam entre 0 e 4200 metros. *Sarconesia chlorogaster* tem distribuição exclusivamente sulamericana, com registros conhecidos para a região sul do Brasil (Paraná e Rio Grande do Sul, Carvalho & Ribeiro 2000), Argentina, Uruguai, e as regiões de altitude próxima a 1000 metros de Bolívia, Peru e Chile (James 1970; Dear 1979). Baumgartner & Greenberg (1985), em um estudo sobre a distribuição de 26 espécies de Calliphoridae do Peru, consideraram *S. chlorogaster* como sendo uma das espécies com maior distribuição altitudinal, distribuída desde regiões montanhosas até regiões alpinas, sempre relacionada a baixas temperaturas, clima subtropical a polar.

Mello (1972) realizou uma redescrição de *S. chlorogaster* a partir de material do Brasil, ilustrando a genitália do macho e da fêmea. Igualmente, Mariluis (1982) redescreveu a espécie, porém utilizando material exclusivamente da Argentina. No entanto, nenhum dos autores anteriores utilizou o espécime tipo para fazer as redescrções. Com relação aos imaturos, também existem descrições na literatura de todas as fases de desenvolvimento (Mello 1972; Greenberg & Szyska 1984; Queiroz & Carvalho 1987; Bonatto & Carvalho 1996).

Existem poucos trabalhos que tratam da biologia e ecologia de espécies do gênero *Sarconesia*. Para *S. chlorogaster*, estudos com aspectos da biologia já foram publicados anteriormente (Greenberg & Szyska 1984; Queiroz *et al.* 1985; Bonatto 1996; Krüger *et al.* 2010), porém, todos analisaram a biologia em temperatura flutuante ou em uma única temperatura constante.

Com relação aos caracteres demográficos, a sobrevivência de *S. chlorogaster* não varia entre os sexos (Bonatto 1996). No entanto, Moura & Bonatto (1999) demonstraram que, embora o resultado final fosse uma sobrevivência semelhante, o caminho que levou a este resultado variou entre os sexos, indicando possíveis diferenças nas trajetórias das características de história de vida. Em uma análise com uma amplitude maior de temperaturas, Costa, Lecheta & Moura (dados não publicados), ao avaliarem o efeito da temperatura na sobrevivência dos adultos em seis temperaturas, constataram que a maior sobrevivência ocorre nas temperaturas de 15°C e 20°C, sendo que nas temperaturas de 10°C e 30°C há uma redução significativa da sobrevivência. Ainda, foi determinado que o efeito da temperatura tem interação com o sexo, sendo que temperaturas superiores a 20°C tendem a sincronizar os efeitos, possivelmente com resultado de uma aproximação aos limites fisiológicos. Já temperaturas inferiores a 15°C tendem a produzir variações na resposta entre os sexos. Esses resultados indicam que o valor adaptativo de *S. chlorogaster*, considerando o tempo de desenvolvimento e a sobrevivência como componentes do *fitness*, está fortemente associado à temperatura.

Assim como a maioria dos califorídeos, as larvas de *S. chlorogaster* podem ter hábitos biontófagos ou necrófagos (Mariluis 1982), causando miíases obrigatórias ou facultativas, sendo importantes no contexto de saúde animal. Além disso, essa espécie também é relevante para a saúde pública devido à sua associação com detritos e resíduos humanos, sendo vetora de doenças e transmissores de patógenos causadores de doenças (Baumgartner & Greenberg 1985; Queiroz & Carvalho 1987; Maldonado & Centeno 2003; Laos *et al.* 2004). Ferreira (1978), em um estudo sobre sinantropia de dípteros muscóideos na região de Curitiba, considerou *S. chlorogaster* como uma das espécies sinantrópicas mais frequentes que ocorrem nessa região.

Também devido ao hábito das larvas, *S. chlorogaster* contribui para a entomologia forense fazendo parte do processo de decomposição de carcaças de animais (Moura *et al.* 1997; Centeno *et al.* 2002; Horenstein *et al.* 2005; Souza *et al.*

2008; Horenstein *et al.* 2010) e de humanos (Lecheta, obs. pessoal), sendo reconhecida como uma das espécies mais importantes dentro da entomologia forense na América do Sul (Carvalho & Mello-Patiu 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amendt, J., C. P. Campobasso, E. Gaundry, C. Reiter, H. N. LeBlanc & M. J. R Hall. 2007. Best practice in forensic entomology – standards and guidelines. **International Journal of Legal Medicine** **121**: 90-104.
- Amendt, J., C. S. Richards, C. P. Campobasso, R. Zehner & M. J. R. Hall. 2011. Forensic entomology: applications and limitations. **Forensic Science, Medicine and Pathology** **7**: 379-392.
- Angilletta, M. J. 2009. **Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis**. Oxford University Press, Oxford, xii+289p.
- Atkinson, D. & R. M. Sibly. 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. **Trends in Ecology and Evolution** **12**: 235-239.
- Atkinson, D. 1994. Temperature and organism size – a biological law of ectotherms? **Advances in Ecological Research** **25**: 1-58.
- Baumgartner, D. L. & B. Greenberg. 1985. Distribution and medical ecology of the blow flies (Diptera: Calliphoridae) of Peru. **Annals of the Entomological Society of America** **78**: 565-587.
- Benecke, M. 2001. A brief history of forensic entomology. **Forensic Science International** **120**: 2-14.
- Bonatto, S. R. 1996. Ciclo de vida de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae), criada sob condições de laboratório em dieta artificial. **Revista Brasileira de Zoologia** **13**: 685-706.
- Bonatto, S. R. & C. J. B. de Carvalho. 1996. Análise morfológica das formas imaturas de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae). **Revista Brasileira de Zoologia** **13**: 707-726.

- Campobasso, C. P., G. D. Vella & F. Introna. 2001. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. **Forensic Science International 120**: 18-27.
- Carvalho, C. J. B & P. B. Ribeiro. 2000. Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 9**: 169-173.
- Carvalho, C. J. B de & C. A. Mello-Patiu. 2008. Key to the adults of the most common forensic species of diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia 52**: 390-406.
- Catts, E. P. 1992. Problems in Estimating the Postmortem Interval in Death Investigations. **Journal of Agricultural Entomology 9**: 245-255.
- Catts, E. P. & M. L. Goff. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology 37**: 253-272.
- Catts, E. P. & N. H. Haskell. 1990. **Entomology & Death: A Procedural Guide**. Joyce's Print Shop, Clemson, xii+182p.
- Centeno, N., M. Maldonado & A. Oliva. 2002. Seasonal patterns of arthropods occurring on sheltered na unsheltered pig carcasses in Buenos Aires Province (Argentina). **Forensic Science International 126**: 63-70.
- Chown, S. L. & S. W. Nicolson. 2004. **Insect Physiological Ecology: Mechanisms and Patterns**. Oxford University Press, Oxford, ix+243p.
- Cossins, A. R. & K. Bowler. 1987. **Temperature Biology of Animals**. Chapman & Hall, New York, 339p.
- Dear, J. P. 1979. A revision of the Toxotarsinae (Diptera, Calliphoridae). **Papéis Avulsos de Zoologia 32**: 145-182.
- Deonier, C. C. 1940. Carcass temperatures and their relation to winter blowfly populations and activity in the southwest. **Journal of Economic Entomology 33**: 166-170.

- Ferreira, M. J. de M. 1978. Sinantropia de dípteros muscóideos de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. **Revista Brasileira de Biologia** **38**: 445-454.
- Goff, M. L. & C. B. Odom. 1987. Forensic Entomology in the Hawaiian Islands: Three Case Studies. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology** **8**: 45-50.
- Greenberg, B. 1991. Flies as Forensic Indicators. **Journal of Medical Entomology** **28**: 565-577.
- Greenberg, B. & M. L. Szyska. 1984. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). **Annals of the Entomological Society of America** **77**: 488-517.
- Gunn, A. 2006. **Essential Forensic Biology**. John Wiley & Sons, Chichester, x+294p.
- Hall, R. D. 2001. Introduction: Perceptions and Status of Forensic Entomology, p. 1-16. *In*: J. H. Byrd & J. L. Castner. (Eds.) **Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations**. 1st ed., CRC Press, Boca Raton, xvii+418p.
- Horenstein, M. B., A. X. Linhares, B. R. Ferradas & D. García. 2010. Decomposition and dipteran succession in pig carrion in central Argentina: ecological aspects and their importance in forensic science. **Medical and Veterinary Entomology** **24**: 16-25.
- Horenstein, M. B., M. I. Arnaldos, B. Rosso & M. D. García. 2005. Estudio preliminar de la comunidad sarcosaprófaga em Córdoba (Argentina): aplicación a la entomología forense. **Anales de Biología** **27**: 191-201.
- Huey, R. B. 2010. Evolutionary physiology of insect thermal adaptation to cold environments, p. 223-241. *In*: D. L. Denlinger & R. E. Lee Jr. (Eds.) **Low Temperature Biology of Insects**. Cambridge University Press, Cambridge, xiii+390p.

- James, M. T. 1970. Family Calliphoridae, p. 102.1-102.28. *In*: N. Papavero (Ed.). **A catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States**. São Paulo, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Fascículo 102, 28p.
- Krüger, R. F., F. D. Kirst & A. S. B. Souza. 2010. Rate of development of forensically-important Diptera in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia 54**: 624-629.
- Laos, F., L. Semenas & V. Labud. Factors related to the attraction of flies at a biosolids composting facility (Bariloche, Argentina). **Science of the Total Environment 328**: 33-40.
- Lord, W. D. & J. R. Stevenson. 1986. **Directory of forensic entomologists**. 2nd ed. Ed. Def. Pest. Mgmt. Info. Anal. Center, Walter Reed Army Medical Center, Washington, D.C., 42p.
- Maldonado, M. A. & N. Centeno. 2003. Quantifying the Potential Pathogens Transmission of the Blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98**: 213-216.
- Mariluis, J. C. 1982. Contribucion al conocimiento de lãs Calliphoridae de La Argentina (Insecta: Diptera). **Opera Lilloana 33**: 1-59.
- Mégnin, P. 1894. **Faune des cadavres. Aplication de L'entomologie a la Médecine Légale**. G. Masson Editeurs, Paris, 214p.
- Mello, R. P. 1972. Contribuição ao estudo do gênero *Sarconesia* Bigot, 1857 (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Biologia 32**: 533-537.
- Moura, M. O., C. J. B. Carvalho & E. L. A. Monteiro-Filho. 1997. A Preliminary analysis of Insects of Medical - Legal Importance in Curitiba, State of Paraná. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 92**: 269-274.
- Moura, M. O. & S. R. Bonatto. 1999. Análise de sobrevivência e estimativa de entropia para *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Zoologia 16**: 221-226.

- Queiroz, S. M. P. & C. J. B. Carvalho. 1987. Chave pictórica e descrição de larvas de 3º instar de Diptera (Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae) em vazadouros de resíduos sólidos domésticos em Curitiba, Paraná. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **16**: 265-288.
- Queiroz, S. M. P., J. R. Almeida, C. J. B. de Carvalho & L. Dudas. 1985. Bionomia de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann, 1830) em Curitiba, Paraná, Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **14**: 105-110.
- Richards, C. S., K. L. Crous & M. H. Villet. 2009. Models of development for blowfly sister species *Chrysomya chloropyga* and *Chrysomya putoria*. **Medical and Veterinary Entomology** **23**: 56-61.
- Souza, A. S. B., F. D. Kirst & R. F. Krüger. 2008. Insects of forensic importance from Rio Grande do Sul state in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia** **52**: 641-646.

Capítulo I

O efeito de temperatura no tempo de desenvolvimento e determinação das exigências térmicas dos estágios imaturos de *Sarconesia chlorogaster* (Diptera, Calliphoridae)

1 INTRODUÇÃO

Para que seja possível a estimativa do IPM através de dados entomológicos (utilizando populações), é necessário que se tenha disponível na literatura dados relativos à duração dos estágios imaturos em diferentes temperaturas. Esses dados de tempo de desenvolvimento geralmente são resumidos em um modelo de grau-dia acumulado (ou GDA) (Amendt *et al.* 2011).

A premissa básica do modelo de grau-dia acumulado é que há uma relação positiva entre a taxa de desenvolvimento e o aumento da temperatura, e que o desenvolvimento cessa abaixo de um limiar mínimo de desenvolvimento (Higley *et al.* 1986; Byrd & Allen 2001; Higley & Haskell 2010; Greenberg & Kunish 2002; Richards & Villet 2009). Esse limiar mínimo é chamado de temperatura base (T_b ou T_0) e determina o limite abaixo do qual o desenvolvimento do inseto cessa.

O GDA tem sido utilizado na agricultura para prever o tempo de aplicações de inseticidas no controle de pragas (Higley *et al.* 1986) e, mais recentemente, também utilizado na área forense para estimar a idade de larvas encontradas em cadáveres através da comparação do material coletado em campo com experimentos feitos em laboratório (Greenberg 1991; Marchenko 2001; Grassberger & Reiter 2001; Grassberger & Reiter 2002; Lefebvre & Paquerault 2004; Richards & Villet 2009).

Dentre os insetos de interesse forense, os mais utilizados para esse tipo de análise são os Diptera da família Calliphoridae (Gunn 2006). Por se tratarem de organismos ectotérmicos, os quais não têm controle metabólico sobre sua temperatura corporal, usam uma proporção da energia ambiental (unidades térmicas) para crescer e se desenvolver (Gennard 2007). No modelo de grau-dia, o desenvolvimento é medido como tempo térmico (de onde deriva a denominação “graus-dia”) e cada estágio de desenvolvimento do inseto exige um número específico de graus-dia acumulados para alcançar o estágio seguinte (Amendt *et al.* 2011). O princípio por trás dessa estimativa é calcular o tempo necessário para chegar ao GDA em que o estágio mais velho de determinada espécie foi coletado no cadáver, na temperatura ambiente que estava no local.

O modelo de grau-dia depende da análise de dados de desenvolvimento de uma espécie em um mínimo de seis temperaturas constantes, para possibilitar uma estimativa precisa do IPM mínimo (Ikemoto & Takai 2000). No entanto, para

espécies de interesse forense, poucas possuem dados de desenvolvimento em mais de cinco temperaturas constantes (Higley & Haskel 2010).

Sarconesia chlorogaster (Wiedemann, 1831) é considerada uma das espécies com maior importância forense na América do Sul (Carvalho & Mello-Patiu 2008; Lecheta, obs. pessoal). Com relação a descritores da biologia de *S. chlorogaster*, o ciclo de vida foi descrito por Bonatto (1996) em temperatura constante e por Krüger *et al.* (2010) em temperatura flutuante, e Greenberg & Szyska (1984) e Queiroz *et al.* (1985) analisaram o período de desenvolvimento das formas imaturas de *S. chlorogaster* em temperatura flutuante. Porém, nenhum dos trabalhos citados analisou a diferença na biologia dessa espécie entre diferentes temperaturas.

Considerando a aplicabilidade de *S. chlorogaster* como estimador de IPM, este capítulo descreve o tempo de desenvolvimento dessa espécie em seis temperaturas diferentes e utiliza o modelo de graus-dia para o cálculo da temperatura base e constante térmica (K), para a utilização desses dados em possíveis estimativas de IPM.

2 OBJETIVOS

- Determinar o efeito da temperatura no tempo de desenvolvimento e emergência de *Sarconesia chlorogaster* (Wied.);
- Determinar a temperatura base, a constante térmica e a velocidade de desenvolvimento para essa espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e manutenção dos exemplares para estudo

Para iniciar a colônia, adultos de *S. chlorogaster* foram coletados na Reserva Mata Viva, localizada no interior do campus Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A coleta foi feita com o auxílio de armadilha modificada de Ferreira (1978), utilizando como isca, sardinha em decomposição. Logo após coletados, os insetos foram levados para o Laboratório de Dinâmicas Ecológicas, Departamento de Zoologia da UFPR, onde foram identificados e triados.

Os espécimes adultos coletados de interesse para este estudo foram acondicionados em gaiolas e permaneceram sob condições controladas de temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo (12:12 horas) e umidade relativa ($70\pm 10\%$). Como substratos para alimentação e postura foram utilizados, respectivamente, dieta à base de açúcar e carne bovina moída crua. A água foi fornecida em frascos de vidro com substrato para pouso confeccionado com gaze.

Os ovos obtidos desta geração parental deram origem à colônia estoque. A partir desta colônia, mantida em temperatura flutuante, foram retiradas as posturas para a manutenção da própria colônia e para a realização dos experimentos.

3.2 Criação em laboratório

Para acompanhar o tempo de desenvolvimento das formas imaturas, bem como determinar o comprimento e peso das larvas durante o desenvolvimento, foram feitas cinco réplicas para cada temperatura (10, 15, 20, 25, 30 e 35°C), cada uma contendo aproximadamente 150 ovos.

As unidades amostrais eram compostas por um recipiente plástico com capacidade de 500 mL contendo 180 g de dieta artificial na qual os ovos eram colocados. Esse recipiente foi colocado dentro de outro recipiente plástico, com capacidade para 1000 mL, o qual continha vermiculita como substrato para pupariação. Ambos os recipientes foram cobertos com tecido do tipo escaline (voal), preso por elástico, para evitar a dispersão das larvas e possível contaminação por outros insetos que viessem a explorar o alimento.

Em todos os experimentos foi utilizada dieta artificial modificada de Estrada *et al.* (2009) para alimentação dos imaturos. Esta dieta contém rúmem bovino, leite em

pó integral, levedo de cerveja, caseína, Nipagin e ágar. Em cada unidade amostral foram utilizados 180 g de dieta para 150 ovos, totalizando aproximadamente 1,2 g de dieta por larva, suficiente para que esta completasse todo o seu desenvolvimento.

Para obtenção das posturas utilizadas nos experimentos foi utilizada carne bovina moída crua, exposta durante três horas nas gaiolas da colônia estoque. Ao final dessas três horas, os ovos foram rapidamente contados, colocados nos potes contendo dieta e alocados aleatoriamente no interior de câmaras climatizadas do tipo BOD.

3.3 Parâmetros biológicos

Para determinar o efeito da temperatura sobre o desenvolvimento de *S. chlorogaster*, neste capítulo foram abordados os seguintes parâmetros biológicos: duração do período total de ovo a adulto, duração de cada estágio de desenvolvimento dos imaturos e emergência dos adultos.

Os experimentos foram feitos em seis temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35°C) utilizando a mesma metodologia, porém com indivíduos de gerações diferentes (F3, F4 e F5), provenientes da colônia estoque. Todos os experimentos foram feitos em temperaturas controladas, variando em um grau a mais ou a menos, $60 \pm 10\%$ de umidade e fotofase de 12 horas.

Para determinar o tempo de incubação dos ovos foram feitas observações a cada hora, iniciando-se 12 horas após a postura até a eclosão das larvas. A observação das larvas iniciou-se logo após a eclosão até a pupariação, em intervalos de seis horas para primeiro e segundo ínstar e de 12 horas para o terceiro ínstar, nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C. Para a temperatura de 15°C, as larvas foram observadas a cada 12 horas e para os experimentos realizados a 10°C em intervalos de 24 horas. Essa diferenciação foi determinada em função do desenvolvimento ser mais lento em temperaturas baixas. Em cada observação, foi utilizada uma amostra de 30 larvas por réplica para determinar em qual ínstar as larvas se encontravam.

O período de pupa foi considerado desde o momento em que as larvas abandonaram a dieta até a emergência do adulto, sem distinguir o período de pós-alimentação (= pré-pupa). Para acompanhar o período de pupa e a emergência dos

adultos, 32 larvas que abandonaram espontaneamente a dieta provenientes de cada réplica foram individualizadas em tubos contendo vermiculita, totalizando 160 larvas por temperatura. Essas larvas foram observadas a cada 24 horas sendo determinado o dia de abandono da dieta, dia de emergência e sexo do adulto originado de cada uma das larvas utilizadas. A mortalidade das pupas em cada temperatura também foi analisada.

3.4 Determinação da constante térmica, temperatura base e taxa de desenvolvimento

As necessidades térmicas de *S. chlorogaster* foram determinadas por meio de uma constante térmica (K), que é uma medida de tempo térmico, expresso em graus-dia, necessário para o inseto atingir cada estágio de desenvolvimento.

O pressuposto essencial do modelo de graus-dia é que o tempo de desenvolvimento dos insetos é diretamente relacionado à temperatura ambiente e que existe uma relação linear positiva entre a taxa de desenvolvimento e o aumento da temperatura (Higley *et al.* 1986).

No entanto, o tempo de desenvolvimento dos insetos apresenta uma relação hiperbólica com a temperatura (Kipyatkov & Lopatina 2010), representada pela equação:

$$D = \frac{K}{T - T_0} \quad (1)$$

em que D é o tempo de desenvolvimento expresso em dias ou horas; T é a temperatura na qual ocorre o desenvolvimento; T_0 é a temperatura base; e K a constante térmica. De acordo com a equação (1), o tempo de desenvolvimento aumenta hiperbolicamente quando a temperatura diminui, sendo que o tempo tende ao infinito quando a temperatura base é atingida (T_b ou T_0). Porém, nenhum inseto apresenta desenvolvimento abaixo da temperatura base, tornando a equação hiperbólica complicada de se analisar e comparar (Kipyatkov & Lopatina 2010). Contudo, uma relação hiperbólica pode ser transformada em uma relação linear usando os valores recíprocos das variáveis (Kipyatkov & Lopatina 2010). Portanto,

se definirmos a taxa de desenvolvimento (R) como a inversa do tempo de desenvolvimento ($R = \frac{1}{D}$), a equação (1) será transformada em uma equação linear (2):

$$R = a + bT \quad (2)$$

em que a é o intercepto e b o coeficiente da regressão linear da taxa de desenvolvimento. No ponto onde $\frac{1}{D}$ for igual a zero (no qual não existe taxa de desenvolvimento) é onde se tem o valor da temperatura base (ou seja, onde a reta de regressão intercepta o eixo x).

A temperatura base pode ser determinada também pela equação de regressão linear (2) quando iguala-se a taxa de desenvolvimento (R) a zero, determinado a assíntota vertical da equação (3):

$$T_0 = \frac{-a}{b} \quad (3)$$

Já, a constante térmica K , a assíntota horizontal, representa um recíproco do coeficiente de regressão e pode ser obtida através da relação (4):

$$K = \frac{1}{b} \quad (4)$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi determinado para verificar a proporção da variação da taxa de desenvolvimento ($\frac{1}{D}$) que é explicada pela regressão, testando o pressuposto de relação linear entre a taxa de desenvolvimento e temperatura. Esses cálculos foram feitos levando em conta somente as temperaturas nas quais houve o desenvolvimento completo dos indivíduos (de 10°C a 30°C), já que os dados de desenvolvimento de temperaturas extremas não devem ser utilizados nos modelos de graus-dia baseados em regressão linear (Higley & Haskel 2010; Ikemoto e Takai 2000).

3.5 Análises

Todas as análises foram feitas no ambiente R (R Development Core Team 2011). Para analisar se existia diferença no tempo de desenvolvimento de *S. chlorogaster* entre as temperaturas, foi ajustado um modelo linear generalizado (GLM) utilizando uma distribuição de erro da família Gamma e uma função de ligação logarítmica. Os contrastes de Tukey ($P \leq 0,05$) foram utilizados para as comparações *a posteriori*. Estas análises foram feitas para cada estágio e para o tempo total de ovo a adulto utilizando o tempo de desenvolvimento como variável resposta e a temperatura como variável preditora. Para o GLM foram utilizadas as bibliotecas MASS (Venables & Ripley 2002) e effects (Fox 2003) e para a análise *a posteriori* foi utilizada a biblioteca multcomp (Hothorn *et al.* 2008).

Para analisar a mortalidade no estágio de pupa foi feita uma análise de variância de um fator ($P \leq 0,05$) e o teste de Tukey ($P \leq 0,05$) para comparações *a posteriori*, utilizando a raiz quadrada da mortalidade como variável resposta e a temperatura como variável preditora. Para o teste de Tukey foram utilizadas as bibliotecas multcomp (Hothorn *et al.* 2008) e multcompView (Graves *et al.* 2011).

A temperatura base (T_b), a constante térmica (K) e a velocidade de desenvolvimento foram determinadas para cada estágio de desenvolvimento e para o período total de ovo a adulto, utilizando-se o método da hipérbole (Kipyatkov & Lopatina 2010). Devido ao crescimento anômalo a 35°C (ver resultados), essa temperatura foi retirada dessa análise.

4 RESULTADOS

A temperatura do ambiente durante o desenvolvimento influenciou tanto o tempo de desenvolvimento quanto a viabilidade das formas imaturas de *S. chlorogaster*. A temperatura afetou significativamente a viabilidade das pupas de *S. chlorogaster* ($F_{5,24}=43,862$, $P<0,001$) (Tabela 1). Dentre as temperaturas testadas as que tiveram os menores valores de mortalidade das pupas foram 15, 20 e 25°C, nas quais observou-se que menos de 4% do total das pupas não emergiram. Nas temperaturas de 10°C e 30°C houve aproximadamente 20% de mortalidade.

Em 35°C houve 100% de mortalidade das pupas, sendo registrada uma má formação em todas as pupas. Após essa observação, outros dois experimentos nas temperaturas de 32°C e 34°C foram realizados para determinar se havia desenvolvimento completo de *S. chlorogaster*. Da mesma forma, o desenvolvimento foi incompleto, não havendo a emergência dos adultos. A partir disso foi estabelecido que o limite superior para o desenvolvimento completo de *S. chlorogaster* é entre 30°C e 31°C.

Tabela 1. Viabilidade das pupas de *Sarconesia chlorogaster* criadas a temperaturas de 10°C a 35°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas. As letras representam os resultados do teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo que temperaturas sem diferença estatística na mortalidade são representadas pelas mesmas letras.

T (°C)	Pupas		
	Total	Não emergiram	
		N	%
10	160	34a	21,25
15	160	05b	3,13
20	160	06b	3,75
25	160	03b	1,88
30	160	31a	19,38
35	160	160c	100,00

Quanto ao tempo de desenvolvimento, considerando todas as temperaturas testadas, o período de eclosão variou de 13,5 horas a 2,7 dias após a postura. Já, o primeiro ínstar larval variou entre 9 horas a 3,9 dias, o segundo ínstar larval de 18 horas a 6,3 dias e o terceiro ínstar larval de 2,3 a 16,8 dias. O período de pupa variou de 11,1 a 69 dias e o período total de ovo a adulto de 15 a 98,7 dias. O tempo

de desenvolvimento de cada estágio e do período total de ovo a adulto nas temperaturas de 10°C a 35°C encontra-se na Tabela 2.

A temperatura afetou significativamente o tempo de desenvolvimento total de ovo a adulto (Deviance=12,436, $\chi^2 < 0,001$, gl=4) e de todos os estágios: ovo (Deviance=10,359, $\chi^2 < 0,001$, gl=5), primeiro ínstar (Deviance=15,013, $\chi^2 < 0,001$, gl=5), segundo ínstar (Deviance=16,1, $\chi^2 < 0,001$, gl=5), terceiro ínstar (Deviance=14,157, $\chi^2 < 0,001$, gl=5) e pupa (Deviance=12,469, $\chi^2 < 0,001$, gl=4).

De forma geral, *S. chlorogaster* aumentou seu tempo de desenvolvimento conforme a diminuição da temperatura, sendo 10°C a temperatura que teve o maior tempo de desenvolvimento em todos os estágios e, consequentemente, o maior período de ovo a adulto.

Tabela 2. Média de tempo de desenvolvimento (M) em horas, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para os estágios imaturos e para o período total de ovo a adulto de *Sarconesia chlorogaster*, criados a temperaturas entre 10°C e 35°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas. As letras representam os resultados do teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo que temperaturas sem diferença estatística na média do tempo de desenvolvimento são representadas pelas mesmas letras.

T (°C)	Tempo de desenvolvimento (horas)																
	Eclosão			1º ínstar			2º ínstar			3º ínstar			Pupa			Ovo-adulto	
	M	DP	CV	M	DP	CV	M	DP	CV	M	DP	CV	M	DP	CV	M	
10	65,28a	2,30	3,52	95,68a	2,77	2,89	150,56a	14,95	9,92	402,75a	114,47	28,42	1655,24a	78,16	4,72	2369,51	
15	33,69b	2,77	8,22	48,16b	1,38	2,86	52,72b	8,89	16,86	144,67b	7,28	5,03	704,36b	25,16	3,57	983,60	
20	21,55c	1,12	5,19	28,04c	3,22	11,48	35,40c	4,70	13,27	102,30c	16,59	16,21	428,92c	52,61	12,26	616,21	
25	16,50d	0,95	5,75	18,20d	1,08	5,93	25,08d	3,11	12,40	73,28d	3,71	5,06	326,98d	13,97	4,27	460,04	
30	13,50e	0,50	3,70	9,00e	3,00	33,33	18,08e	3,26	18,03	54,00e	6,00	11,11	265,97e	6,61	2,48	360,55	
35	13,92e	0,34	2,44	19,60d	2,66	13,57	20,96e	5,19	24,76	74,10cd	6,80	9,17	*	*	*	*	

* Não houve desenvolvimento completo na temperatura de 35°C.

Na Tabela 2 pode ser observado que, no geral, os tempos de desenvolvimento diferiram significativamente entre si com relação ao efeito da temperatura nos diferentes estágios e no período total de ovo a adulto. Porém, esse padrão não foi observado na temperatura de 35°C, na qual todas as etapas de desenvolvimento (exceto pupa e adulto) não foram significativamente diferentes a

alguma outra temperatura, assemelhando-se principalmente às temperaturas de 25°C e 30°C.

Com relação ao coeficiente de variação (CV), os valores obtidos indicam que a eclosão tende a ser mais sincronizada em temperaturas extremas, sendo o menor valor do CV a 35°C. Já as temperaturas de 15°C e 25°C possuem os maiores valores e deixam um intervalo maior para a eclosão das larvas. Nas larvas de primeiro ínstar o desenvolvimento tende a ser mais sincronizado nas temperaturas inferiores, variando mais nas temperaturas de 20, 30 e 35°C. No segundo ínstar os extremos se destacam novamente, com 10°C sincronizando e 35°C deixando a mudança de ínstar mais variado. O terceiro ínstar não apresenta um padrão notório e as pupas seguem um ritmo mais homogêneo, exceto a 20°C que apresentou um valor de coeficiente de variância maior.

A velocidade de desenvolvimento nos diferentes estágios e no período total de ovo a adulto aumentou conforme o aumento da temperatura, conforme as retas de velocidade de desenvolvimento nas Figuras 1 e 2. Na Tabela 3 pode-se observar que os ajustes das equações da reta da velocidade de desenvolvimento foram bons, indicando boa adequabilidade dos dados ao modelo linear. De maneira geral, as equações obtidas explicam mais de 99% da variação da taxa de desenvolvimento. O estágio de desenvolvimento com o menor ajuste ao modelo linear (menor valor de coeficiente de determinação) foi o primeiro ínstar larval, em que a temperatura explica aproximadamente 87% da variação da taxa de desenvolvimento.

De forma geral, a temperatura base foi semelhante para todos os estágios de desenvolvimento, em torno de 6°C, com exceção do primeiro ínstar larval que apresentou temperatura base de 10,11°C (Tabela 3). A partir desse resultado, foi realizado um experimento na temperatura de 8°C, para observar se havia desenvolvimento nessa temperatura, e constatou-se que *S. chlorogaster* desenvolveu-se normalmente a 8°C, embora o tempo de desenvolvimento seja muito longo (Lecheta, obs. pessoal).

Através dos valores da constante térmica K (Tabela 3) pode-se observar que todos os estágios de desenvolvimento apresentam exigências térmicas diferentes. De maneira geral, quanto mais avançado o estágio de desenvolvimento, maior a quantidade de calor que o inseto necessitará acumular para mudar para o próximo estágio. A exceção a esse padrão foi o primeiro ínstar larval, que necessita acumular uma menor quantidade de calor que a fase de ovo para mudar de estágio.

Os valores da temperatura basal (Tb), constante térmica (K) e as equações da taxa de desenvolvimento encontram-se na Tabela 3. Os gráficos com as retas de velocidade de desenvolvimento e as curvas de tempo de crescimento para cada estágio e para o desenvolvimento total de ovo a adulto estão representados nas Figuras 1 e 2.

Tabela 3. Temperatura base (Tb), constante térmica (K) e equações da velocidade de desenvolvimento para cada estágio imaturo e para o período total de ovo a adulto de *Sarconesia chlorogaster*, criados às temperaturas de 10°C a 30°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas.

	Tb (°C)	K (graus-dia)	Equação da taxa de desenvolvimento	R ²
Ovo	4,77	14,04	1/D = 0,3397+0,0712 T	0,9987
1º ínstar	10,11	8,85	1/D = -1,1427+0,1130 T	0,8768
2º ínstar	7,40	17,62	1/D = -0,4197+0,0567 T	0,9928
3º ínstar	6,77	53,69	1/D = -0,1261+0,0186 T	0,9933
Pupa	5,95	262,06	1/D = -0,0226+0,0038 T	0,9974
Total	6,33	355,51	1/D = -0,0178+ 0,0028 T	0,9998

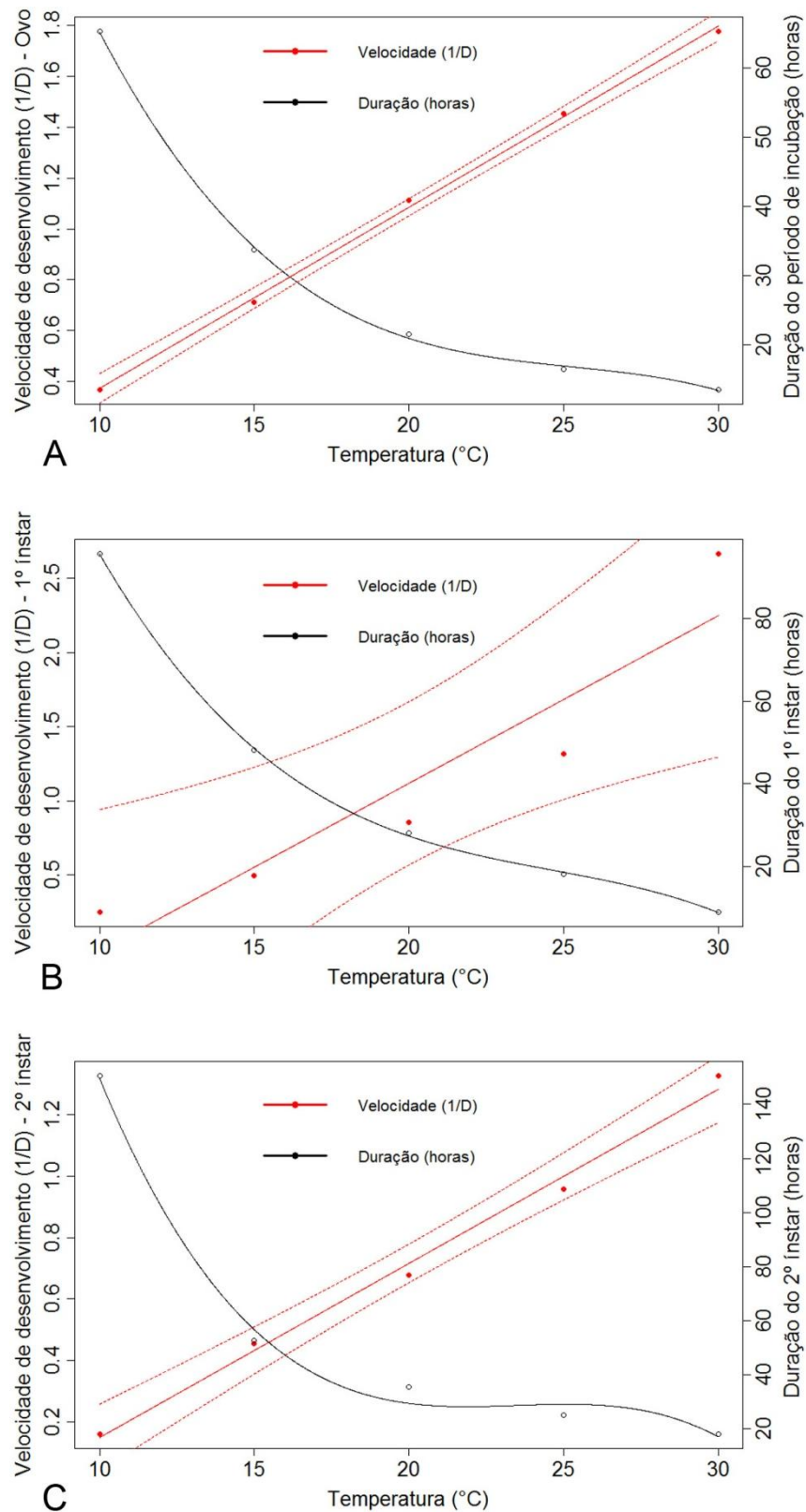


Figura 1. Velocidade de desenvolvimento ($\frac{1}{D}$) e duração (em horas) do tempo de desenvolvimento de *Sarconesia chlorogaster*, estimados a partir de temperaturas constantes de 10°C a 30°C para o período de incubação (a), primeiro ínstar (b) e segundo ínstar (c). A linha da duração do desenvolvimento corresponde a uma curva ajustada por polinômio e as linhas pontilhadas correspondem ao intervalo de confiança do modelo ajustado.

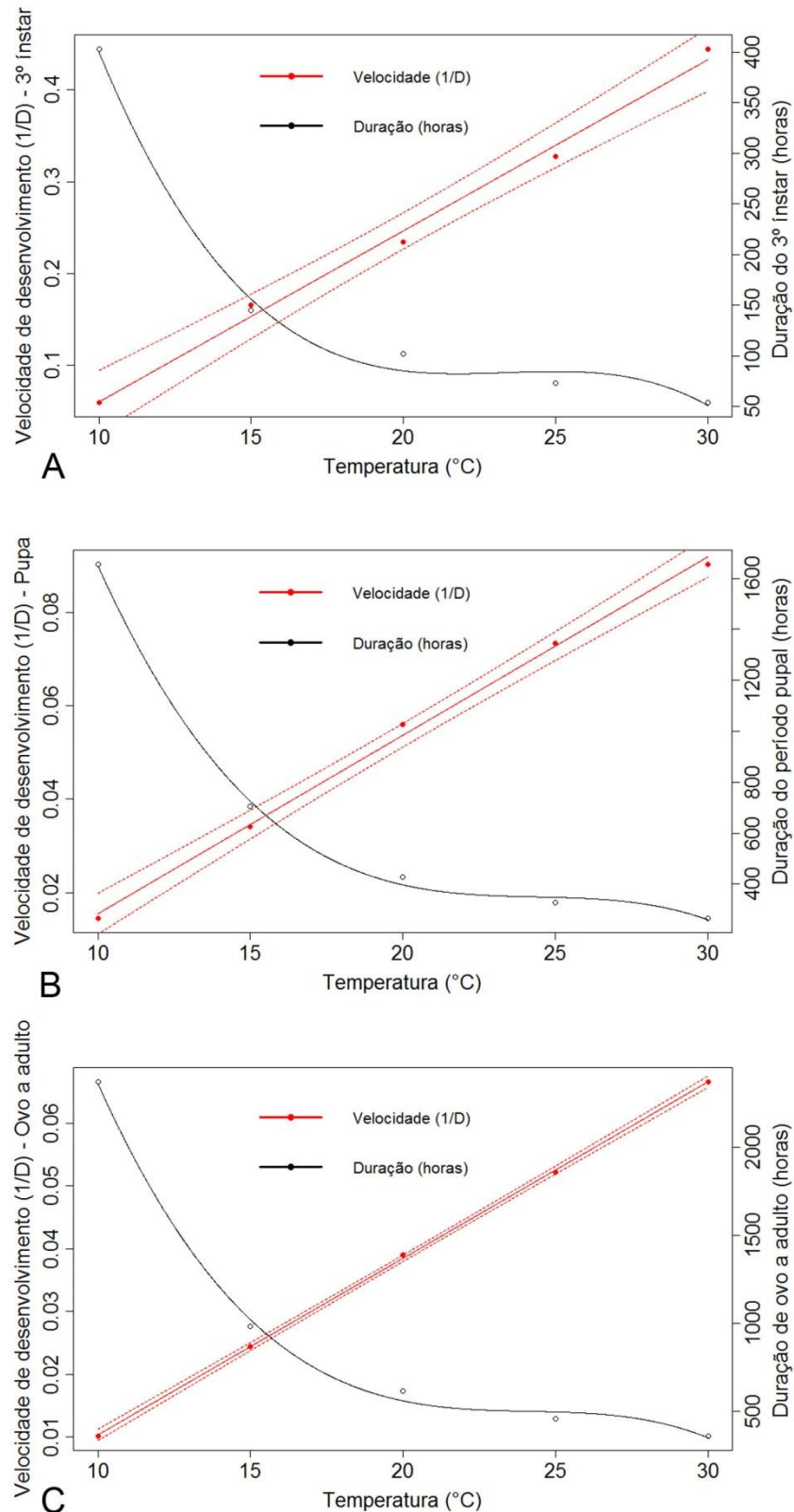


Figura 2. Velocidade de desenvolvimento ($\frac{1}{D}$) e duração (em horas) do tempo de desenvolvimento de *Sarconesia chlorogaster*, estimados a partir de temperaturas constantes de 10°C a 30°C para o terceiro ínstar (a), período de pupa (b) e período de ovo a adulto (c). A linha da duração do desenvolvimento corresponde a uma curva ajustada por polinômio e as linhas pontilhadas correspondem ao intervalo de confiança do modelo ajustado.

5 DISCUSSÃO

5.1 Desenho experimental e exigências térmicas

Para a aplicação de dados de desenvolvimento na entomologia forense é extremamente importante que se conheça a variação dos parâmetros relacionados à biologia em função da temperatura. Isso ocorre porque as variações na temperatura são determinantes na fisiologia dos insetos e, conseqüentemente, no tempo de desenvolvimento das formas imaturas (Chow & Nicolson 2004), tal como foi observado neste estudo para a espécie em questão.

O desenho experimental vai depender muito da resposta da espécie ao fator estudado, por isso e pelo fato do desenvolvimento de *S. chlorogaster* ter sido muito lento e extenso em determinadas faixas térmicas, optou-se por um intervalo de observação das larvas maior do que o indicado por Richards & Villet (2009) para as temperaturas de 10 e 15°C. Contudo, o grau de confiabilidade exigida para o uso destes dados em futuras estimativas do IPM, quando necessário, foi mantida ao concluir a observação do desenvolvimento desta espécie em no mínimo seis temperaturas distintas (Ikemoto & Takai 2000).

No geral, *S. chlorogaster* tem o padrão de tempo de desenvolvimento muito semelhante a outras espécies de califorídeos: quanto maior a temperatura menor o tempo de desenvolvimento, até atingir o limite superior de desenvolvimento (Grassberger & Reiter 2001, 2002; Thyssen 2005; Richards *et al.* 2008, 2009; Boatright & Tomberlin 2010; Gosselin *et al.* 2010; Tarone *et al.* 2011). Porém, os valores da temperatura base e constante térmica K variam muito entre espécies e até mesmo dentro da própria espécie.

Dentre os trabalhos consultados, *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805) e *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) foram as espécies que apresentaram os menores valores calculados de temperatura base (-17,37°C e -21,89°C, respectivamente) (Thyssen 2005). *Sarconesia chlorogaster* foi a que apresentou a temperatura base positiva mais baixa (6,33°C). *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) teve sua temperatura base calculada em 9,55°C (Gosselin *et al.* 2010), *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy, 1830) em 9,8°C (Grassberger & Reiter 2002), *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) em 10,91°C (Richards *et al.* 2009), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) em 12,99°C (Richards *et al.* 2008) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) em 13,42°C (Richards *et al.* 2009).

O valor da constante térmica K de *S. chlorogaster* (355,51 graus-dia) é muito semelhante ao valor encontrado para o califórideo *C. chloropyga* (330,04 graus-dia) (Richards *et al.* 2009), sendo esses valores um pouco acima dos encontrados para as espécies *C. putoria* (266,47 graus-dia) (Richards *et al.* 2009) e para três populações de *L. sericata* (267,71 graus-dia, 270,62 graus-dia e 277,37 graus-dia) (Tarone *et al.* 2011). *P. terraenovae* (240,2 graus-dia) (Grassberger & Reiter 2002), e outra população estudada de *L. sericata* (217,97 graus-dia) (Gosselin *et al.* 2010) tiveram os valores mais baixos. Dentre os trabalhos analisados, *C. albiceps*, *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* foram as espécies que tiveram os valores mais altos da constante térmica K: 415,63 graus-dia (Richards *et al.* 2008), 567,7 graus-dia e 843,94 graus-dia (Thyssen 2005), respectivamente.

Grassberger & Reiter (2001), também estudando o desenvolvimento de *Lucilia sericata*, sob 10 temperaturas constantes (15°C a 34°C), observaram que a espécie não completou seu desenvolvimento a 15°C. Os autores também concluíram que os resultados encontrados variaram com relação aos resultados encontrados com a mesma espécie em outros trabalhos, e sugeriram um diferente comportamento termal de *L. sericata* em outras regiões biogeográficas.

Através desses trabalhos, é possível concluir que os padrões de desenvolvimento variam consideravelmente entre as espécies, mesmo dentre as espécies da mesma família, e que a utilização de dados de uma espécie para prever padrões de outra pode trazer tanta incerteza que não deve ser feita. Outro ponto importante é a variação da biologia dentro de uma mesma espécie, entre populações diferentes, como visto para *L. sericata* (Grassberger & Reiter 2001). Essa variação dentro da própria espécie pode ser causada pela variação nas pressões seletivas nas populações ao longo da distribuição geográfica (Grassberger & Reiter 2001; Richards *et al.* 2008; Gosselin *et al.* 2010). Por isso, ressalta-se a importância de se fazer outros estudos de biologia com *S. chlorogaster*, porém utilizando outras populações da espécie, para constatar se ocorrem e quais seriam as mudanças considerando diferentes populações, inclusive as possíveis implicações de tais resultados nas estimativas do IPM.

Além da temperatura, a presença de drogas e outros fatores bióticos e abióticos que possam contribuir para alterar o tempo de desenvolvimento de *S. chlorogaster* deveriam ser levados em conta dentro da análise de novas variáveis, a

fim de se tornar cada vez mais aplicável e confiável a utilização de insetos no âmbito médico-legal.

5.2 Tempo de desenvolvimento das formas imaturas de *S. chlorogaster*

Greenberg & Szyska (1984) analisaram o tempo de desenvolvimento das formas imaturas dessa e de outras três espécies do gênero (*S. magellanica* (Le Guillou, 1842), *S. splendida* Townsend, 1918 e *S. versicolor* Bigot, 1857), coletadas no Peru, em temperatura flutuante (entre 13,7°C e 24,8°C) e em dieta de peixe ou fígado. Para *S. chlorogaster* observaram um período de 24 a 36 horas para a eclosão dos ovos, 24 a 49 horas para o primeiro ínstar larval, 49 a 60 horas para o segundo ínstar larval, 189 a 203 horas para o terceiro ínstar larval e pré-pupa, e 11 a 12 dias para o período de pupa, totalizando de 23,1 a 25,5 dias para o período total de desenvolvimento do ovo ao adulto.

Queiroz *et al.* (1985) também analisaram o período de desenvolvimento das formas imaturas de *S. chlorogaster* em temperatura não controlada, oscilando de 22,2°C a 29,3°C, com espécimes coletados na zona urbana de Curitiba, Paraná, utilizando carne bovina para alimentação dos imaturos. Nesse trabalho, os autores observaram que o período total de larva foi de 13,13 a 14,60 dias e o período de pupa entre 14,26 e 15,72 dias, totalizando aproximadamente 28 dias para o período total de ovo a adulto.

Bonatto (1996) observou o desenvolvimento de *S. chlorogaster* sob temperatura, umidade e fotoperíodo controlados em laboratório, sob condições semelhantes à do presente estudo, porém, utilizando somente a temperatura de 27°C. A essa temperatura, Bonatto (1996) observou um período de 14,30 horas para a eclosão dos ovos, 23,34 horas para o primeiro ínstar larval, 37,76 horas para o segundo ínstar larval, 165,56 horas para o terceiro ínstar larval e 9,57 dias para o período de pré-pupa e pupa, totalizando assim, 19,61 dias para o período total de ovo a adulto. Krüger *et al.* (2010) em Pelotas, Rio Grande do Sul, verificaram uma duração média de 35 dias para o período total de ovo a adulto de *S. chlorogaster* em uma temperatura média de 13,6°C durante o inverno local, com as larvas alimentando-se de carne moída bovina.

Os dados obtidos no presente trabalho em relação ao tempo de desenvolvimento de *S. chlorogaster*, em geral são muito parecidos com os dados

obtidos nos trabalhos citados acima, em temperaturas semelhantes. Greenberg & Szyska (1984) obtiveram valores de tempo de desenvolvimento próximos ao tempo obtido nas temperaturas de 15°C e 20°C no presente estudo. Queiroz (1985) obteve um tempo total de desenvolvimento mais próximo ao valor encontrado a 20°C no atual trabalho, abrangendo a faixa de temperatura na qual a criação foi feita. Krüger *et al.* (2010) também obtiveram valores parecidos para essa espécie, se comparado à temperatura de 15°C nesse estudo.

Variações temporais e em diferentes regiões no desenvolvimento de espécies podem ocorrer devido a fatores intrínsecos, como por exemplo, a história de vida das populações, mas apesar disso, esses resultados mostram certa homogeneidade na resposta de *S. chlorogaster*, mesmo sendo criada em temperaturas flutuantes.

Comparando mais detalhadamente as médias dos tempos de desenvolvimento do estudo de Bonatto (1996) com as médias obtidas nas diferentes temperaturas do atual trabalho, pode-se concluir que os tempos de desenvolvimento dos três estágios larvais de Bonatto (1996) a 27°C aproximaram-se mais ao tempo de desenvolvimento obtido em temperaturas inferiores a 25°C do atual trabalho. No primeiro ínstar larval o tempo de desenvolvimento obtido por Bonatto (1996) ficou entre o tempo de desenvolvimento das temperaturas de 25°C e 20°C; no segundo ínstar larval o tempo de desenvolvimento ficou semelhante à temperatura de 20°C; e no terceiro ínstar larval o tempo de desenvolvimento se assemelhou mais à temperatura de 15°C. Essa diferença nos resultados encontrados por Bonatto (1996) para o atual trabalho pode ser atribuída à dieta utilizada para a alimentação das larvas, proposta por Leal *et al.* (1982), a qual não contém nenhum tipo de tecido animal, diferentemente da utilizada no atual trabalho que contém rúmen bovino, proposta por Estrada *et al.* (2009).

Estrada *et al.* (2009) testaram o efeito de diferentes tipos de dietas no desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae), que assim como *S. chlorogaster*, tem importância forense e desenvolve-se em matéria orgânica animal em decomposição (Carvalho *et al.* 2000). A comparação foi feita entre a dieta de Leal *et al.* (1982) e outras dietas que continham tecido animal em sua composição (fígado bovino, músculo bovino, rúmen bovino e coração de frango) com um grupo controle que era alimentado somente com carne bovina moída. Os resultados indicaram que a dieta proposta por Leal *et al.* (1982) foi insuficiente para um bom desenvolvimento da espécie *C. albiceps*, não permitindo um bom ganho de peso e

aumentando seu tempo de desenvolvimento quando comparado aos outros grupos, além de ocasionar a morte de todas as larvas testadas. Já a dieta que continha rúmen bovino em sua composição foi a mais eficiente e bastante similar ao grupo controle (Estrada *et al.* 2009).

Considerando o estudo de Bonatto (1996) para a espécie *S. chlorogaster*, a dieta proposta por Leal *et al.* (1982) permitiu o desenvolvimento completo dessa espécie, porém pode ter aumentado o tempo de desenvolvimento dos estágios larvais. Isso pode ter sido resultado de um menor ganho de peso pelas larvas por unidade de tempo, e as mesmas terem de ficar mais tempo se alimentando para atingir o peso mínimo necessário para mudar para o próximo estágio.

Outra possível explicação para a diferença no tempo médio dos três instares larvais encontrado entre o atual trabalho e o de Bonatto (1996) é a quantidade de larvas utilizada por réplica. Bonatto (1996) utilizou 10 larvas por réplica e no atual trabalho foram utilizadas 150 larvas por réplica. Esse efeito pode ser mediado pela agregação larval e seus efeitos na temperatura de desenvolvimento da massa de larvas.

Larvas de califorídeos formam massas larvais enquanto se alimentam, documentadas há pelo menos 65 anos (Deonier 1940), as quais geram calor interno, possivelmente através de processos digestivos exotérmicos (Slone & Gruner 2007). O desenvolvimento dos ovos e o início do período das larvas de primeiro instar estão em sincronia com a temperatura ambiente, mas a partir do segundo instar e principalmente no terceiro instar larval, o calor gerado pela atividade da massa de larvas excede a temperatura ambiente e produz um nível estável de calor, ideal para um desenvolvimento larval acelerado (Catts 1992).

Alguns trabalhos indicam que um desenvolvimento mais rápido é observado em ambientes onde há mais larvas aglomeradas (Saunders & Bee 1995; Ireland & Turner 2006; Slone & Gruner 2007). Goodbrod & Goff (1990) estudaram os efeitos da densidade da massa de larvas e a geração de calor por essas massas durante o desenvolvimento em laboratório das espécies *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1842) (Diptera, Calliphoridae) demonstrando uma relação inversa entre a densidade e a duração do estágio larval. Portanto, pode-se sugerir que as médias de tempos de desenvolvimento dos instares larvais do atual trabalho foram menores que as médias do trabalho de

Bonatto (1996), devido à maior densidade de larvas na massa larval, gerando com isso mais calor interno e, conseqüentemente, menor tempo de desenvolvimento.

5.3 Modelo de dias-acumulados (GDA), temperatura base e limiar máximo de desenvolvimento e suas implicações para a estimativa do IPM

O modelo de dias-acumulados utilizado nessa dissertação utiliza a hipótese da linearização do desenvolvimento, considerando que a taxa de desenvolvimento do inseto e a temperatura têm uma relação linear (Arnold 1959; Higley *et al.* 1986). A partir desse pressuposto, foi possível obter equações para cada etapa do desenvolvimento de *S. chlorogaster*.

Para a obtenção da temperatura base, a reta dessa regressão linear foi extrapolada para o eixo x, no ponto no qual a taxa de desenvolvimento é zero. Essa temperatura base determinada pela interceptação no eixo x não tem, necessariamente, significado biológico, sendo apenas uma consequência matemática da aproximação da taxa de desenvolvimento através da regressão linear. Conseqüentemente, a temperatura base utilizada para calcular os dias-acumulados pode estar acima ou abaixo da temperatura base real ou biológica.

Porém, se utilizássemos a temperatura base biológica, ao invés da temperatura base obtida através da regressão linear, estaríamos violando a premissa básica da linearidade do modelo de graus-dia (isto é, a taxa de desenvolvimento não é constante ao longo da temperatura), e isso levaria a erros na estimativa do desenvolvimento (Higley & Haskell 2010). Ao utilizar valores mais elevados de temperatura base do que o calculado pela regressão implica que menos graus-dia acumulados são necessários para o desenvolvimento do que é realmente o caso. Da mesma forma, quando valores mais baixos do que a temperatura base calculada são utilizados, mais graus-dias acumulados são necessários do que o valor verdadeiro (Nabity *et al.* 2006).

Os dados obtidos nesse estudo mostraram que *S. chlorogaster* é capaz de se desenvolver em temperaturas a partir de 8°C. Essa temperatura é similar a temperatura base calculada pela extrapolação da regressão linear (aproximadamente 6°C). Porém, ainda são necessários mais estudos para conhecer a real temperatura base biológica dessa espécie, já que não foram realizados experimentos abaixo de 8°C.

Ainda sobre a temperatura base, é sugerido que na falta de dados sobre a biologia de espécies de moscas de interesse forense, poderia ser utilizada a temperatura base de 10°C para as espécies de regiões tropicais e 6°C para espécies de regiões temperadas (Higley & Haskell 2010). Essa temperatura de 10°C já foi utilizada como a temperatura base de *S. chlorogaster*, para obter valores de grau-dia acumulado para cada estágio de desenvolvimento, sendo que esses valores poderiam, segundo os autores, ser utilizados em uma estimativa do IPM (Oliveira-Costa 2007).

A temperatura base para *S. chlorogaster* calculada no atual trabalho, para todo o desenvolvimento, foi de 6,33°C, um valor diferente do sugerido para as espécies de regiões tropicais. E, apesar de ter uma distribuição tropical, *S. chlorogaster* ocorre em regiões mais frias, com climas mais temperados. Por isso, sugere-se que estudos futuros sobre o desenvolvimento de espécies de importância forense deveriam estimar a temperatura base de desenvolvimento, para que possíveis erros na utilização de “temperaturas bases generalizadas” sejam evitados.

Por outro lado, o limiar máximo de temperatura geralmente é ignorado no cálculo dos graus-dias acumulados, pela justificativa de que as temperaturas altas raramente estão em um nível suficiente para produzir efeito letal (Wilson & Barnett 1983). Os limites superiores de temperatura raramente são experimentados quando se investiga cenas de crime, porém, se as temperaturas se mantêm iguais ou próximas ao limite superior por algum período, isso vai afetar a precisão da estimativa do IPM, já que o crescimento do inseto será mais lento do que o esperado (Gennard 2007).

Considerando que em algumas épocas do ano mesmo os estados do sul do Brasil podem atingir temperaturas bem elevadas, e considerando também que, nesse trabalho, o limiar máximo para *S. chlorogaster* foi entre 30°C e 31°C é importante que se leve em conta o limiar máximo para essa espécie nas estimativas do IPM, dependendo das temperaturas diárias.

Determinar os limiares de desenvolvimento e os valores de grau-hora ou grau-dia para cada estágio de desenvolvimento é um importante pré-requisito para o uso do modelo de graus-dia acumulado (GDA) para as estimativas do IPM (Higley & Haskell 2010).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amendt, J., C. S. Richards, C. P. Campobasso, R. Zehner & M. J. R. Hall. 2011. Forensic entomology: applications and limitations. **Forensic Science, Medicine and Pathology** **7**: 379-392.
- Arnold, C. Y. 1959. The determination and significance of the base temperature in a linear heat unit system. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science** **74**: 430-445.
- Bonato, S. R. 1996. Ciclo de vida de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae), criada sob condições de laboratório em dieta artificial. **Revista Brasileira de Zoologia** **13**: 685-706.
- Byrd, J. H. & J. C. Allen. 2001. Computer Modeling of Insect Growth and its Application to Forensic Entomology, p. 303-330. *In*: J. H. Byrd & J. L. Castner. (Eds.) **Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations**. 1st ed., CRC Press, Boca Raton, xvii+418p.
- Carvalho, C. J. B. de & C. A. de Mello-Patiu. 2008. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia** **52**: 390-406.
- Carvalho, L. M. L., P. J. Thyssen, A. X. Linhares & F. A. B. Palhares. 2000. A Checklist of Arthropods Associated with Pig Carrion and Human Corpses in Southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **95**: 135-138.
- Catts, E. P. 1992. Problems in Estimating the Postmortem Interval in Death Investigations. **Journal of Agricultural Entomology** **9**: 245-255.
- Chown, S. L. & S. W. Nicolson. 2004. **Insect Physiological Ecology: Mechanisms and Patterns**. Oxford University Press, Oxford, ix+243p.
- Deonier, C. C. 1940. Carcass temperatures and their relation to winter blowfly populations and activity in the southwest. **Journal of Economic Entomology** **33**: 166-170.

- Estrada, D. A., M. D. Grella, P. J. Thyssen & A. X. Linhares. 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya abiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. **Neotropical Entomology** **38**: 203-207.
- Ferreira, M. J. de M. 1987. Sinantropia de dípteros muscóideos de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. **Revista Brasileira de Biologia** **38**: 445-454.
- Fox, J. 2003. Effect Displays in R for Generalised Linear Models. **Journal of Statistical Software** **8**: 1-27. <http://www.jstatsoft.org/v08/i15/>.
- Gennard, D. E. 2007. **Forensic Entomology: An Introduction**. John Wiley & Sons, Chichester, xix+224p.
- Goodbrod, J. R. & M. L. Goof. 1990. Effects of Larval Population Density on Rates of Development and Interactions Between Two Species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in Laboratory Culture. **Journal of Medical Entomology** **27**: 338-343.
- Gosselin, M., D. Charabidze, C. Fripiat, B. Bourel D. Gosset & P. Rasmont. 2010. Development Time Variability: Adaptation of Régnière's Method to the Intrinsic Variability of Belgian *Lucilia sericata* (Diptera, Calliphoridae) Population. **Journal of Forensic Research** **1**: 109.
- Grassberger, M. & C. Reiter. 2001. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. **Forensic Science International** **120**: 32-36.
- Grassberger, M. & C. Reiter. 2002. Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). **Forensic Science International** **128**: 177-182.
- Graves S., H. Piepho & L. Selzer with help from S. Dorai-Raj. 2011. **multcompView: Visualizations of Paired Comparisons**. R package version 0.1-3. <http://CRAN.R-project.org/package=multcompView>.

- Greenberg, B. 1991. Flies as Forensic Indicators. **Journal of Medical Entomology** **28**: 565-577.
- Greenberg, B & J. C. Kunich. 2002. **Entomology and the Law: Flies as Forensic Indicators**. Cambridge University Press, Cambridge, xiii+330p.
- Greenberg, B. & M. L. Szyska. 1984. Immature Stages and Biology of Fifteen Species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). **Annals of the Entomological Society of America** **77**: 488-517.
- Gunn, A. 2006. **Essential Forensic Biology**. John Wiley & Sons, Chichester, x+294p.
- Higley, L. G. & N. H. Haskell. 2010. Insect Development and Forensic Entomology, p. 389-406. *In*: J. H. Byrd & J. L. Castner. (Eds.) **Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations**. 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, xxiii+681p.
- Higley, L. G., L. A. Pedigo & K. R. Ostlie. 1986. DEGDAY: A Program for Calculating Degree-days, and Assumptions Behind the Degree-day Approach. **Environmental Entomology** **15**: 999-1016.
- Hothorn, T., F. Bretz & P. Westfall. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. **Biometrical Journal** **50**: 346-363.
- Ikemoto, T. & K. Takai. 2000. A New Linearized Formula for the Law of Total Effective Temperature and the Evaluation of Line-Fitting Methods with Both Variables Subject to Error. **Environmental Entomology** **29**: 671-682.
- Ireland, S. & B. Turner. 2006. The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. **Forensic Science International** **159**: 175-181.
- Kipyatkov, V. E. & E. B. Lopatina. 2010. Intraspecific Variation of Thermal Reaction Norms for Development in Insects: New Approaches and Prospects. **Entomological Review** **90**: 163-184.

- Krüger, R. F., F. D. Kirst & A. S. B. Souza. 2010. Rate of development of forensically-important Diptera in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia** **54**: 624-629.
- Leal, T. T. de S., A. P. do Prado & A. J. Antunes. 1982. Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) on oligidic diets. **Revista Brasileira de Zoologia** **1**: 41-44.
- Lefebvre, F. & T. Pasquerault. 2004. Temperature-dependent development of *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830) and *Ophyra capensis* (Wiedemann, 1818) (Diptera, Muscidae). **Forensic Science International** **139**: 75-79.
- Marchenko, M. I. 2001. Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of death. **Forensic Science International** **120**: 89-109.
- Nabity, P. D., L. G. Higley & T. M. Heng-Moss. 2006. Effects of Temperature on Development of *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) and Use of Developmental Data in Determining Time Intervals in Forensic Entomology. **Journal of Medical Entomology** **43**: 1276-1286.
- Oliveira-Costa, J. **Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios**. 2ª ed. Millenium, Campinas, 420p.
- Queiroz, S. M. P., J. R. de Almeida, C. J. B. de Carvalho & L. Dudas. 1985. Bionomia de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) em Curitiba, Paraná, Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **14**: 105-110.
- R Development Core Team 2011. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Richards, C. S. & M. H. Villet. 2008. Factor affecting accuracy and precision of thermal summation models of insect development used to estimate post-mortem intervals. **International Journal of Legal Medicine** **122**: 401-408.

- Richards, C. S. & M. H. Villet. 2009. Data quality in thermal summation development models for forensically important blowflies. **Medical and Veterinary Entomology** **23**: 269-276.
- Saunders, D. S. & A. Bee. 1995. Effects of larval crowding on size and fecundity of the blow fly, *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). **European Journal of Entomology** **92**: 615-622.
- Slone, D. H. & S. V. Gruner. 2007. Thermoregulation in Larval Aggregations of Carrion-Feeding Blow Flies (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology** **44**: 516-523.
- Tarone, A. M., C. J. Picard, C. Spiegelman & D. R. Foran. 2011. Population and Temperature Effects on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) Body Size and Minimum Development Time. **Journal of Medical Entomology** **48**: 1062-1068.
- Thyssen, P. J. 2005. **Caracterização das formas imaturas e determinação das exigências térmicas de duas espécies de califorídeos (Diptera) de importância forense**. Tese (Doutorado em Parasitologia). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 116p.
- Venables, W. N. & B. D. Ripley. 2002. **Modern Applied Statistics with S**. 4th ed. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0.
- Wilson, L. T. & W. W. Barnett. 1983. Degree-days: an aid in crop and pest management. **California Agriculture** **37**: 4-7.

Capítulo II

**O efeito de temperatura em características biométricas das larvas de
Sarconesia chlorogaster (Diptera, Calliphoridae)**

1 INTRODUÇÃO

Estimar a idade dos insetos coletados em carcaças é um elemento chave para a análise da entomofauna cadavérica (Catts & Haskell 1990). Entre os métodos mais utilizados para esse fim, juntamente com o cálculo do grau dia-acumulado (GDA), estão as análises do comprimento e do peso das larvas encontradas em carcaças (Wells & LaMotte 1995; Richards *et al.* 2008). Parâmetros como peso e comprimento são extremamente dependentes da temperatura sob a qual uma forma imatura se desenvolve. Assim, uma vez conhecidos e disponibilizados dados na literatura sobre a variação do crescimento em diferentes temperaturas, torna-se possível estimar quanto tempo uma larva levou para alcançar determinado estágio de desenvolvimento e consequentemente obter informações a respeito do intervalo pós-morte (IPM) de um cadáver.

O comprimento e o peso das larvas de Calliphoridae, principalmente no segundo e terceiro ínstaes, dependem da espécie e são influenciados principalmente pela dieta e temperatura na qual os indivíduos são criados (Greenberg & Kunich 2002). Desde a eclosão até a pupariação, o peso e o comprimento das larvas são relacionados, aumentando durante o estágio de alimentação e diminuindo na fase de dispersão (Nishida 1984; Davies & Ratcliffe 1994).

Atualmente, há diversos trabalhos na literatura que tratam sobre variados aspectos do desenvolvimento pós-embrionário de insetos de importância forense, especialmente os pertencentes às famílias Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae. Na maioria desses trabalhos, os autores analisam o tempo de desenvolvimento e o comprimento das larvas durante o desenvolvimento, porém ainda são escassos os que exploram as medidas de peso (Clark *et al.* 2006; Day & Wallman 2006; Estrada *et al.* 2009; Niederegger *et al.* 2010; Richards *et al.* 2008; Vélez & Wolff 2008; Wells & Kurahashi 1994; Grassberger & Reiter 2001, 2002; Thyssen 2005).

Tanto o peso quanto o comprimento têm seus prós e contras para a preservação e medição das larvas e posterior análise dos dados. Porém, quando for possível, é importante que se analise e compare o resultado dessas duas metodologias, pois isso aumenta a confiabilidade dos dados e, consequentemente, da estimativa do IPM, já que o peso e o comprimento são relacionados.

Para *Sarconesia chlorogaster* (Diptera, Calliphoridae), espécie com importância forense na América do Sul (Carvalho & Mello-Patiu 2008; Lecheta obs. pessoal), ainda não existem dados publicados sobre o peso e comprimento durante o desenvolvimento. Portanto, o presente capítulo teve como objetivo principal estudar o crescimento de *S. chlorogaster* em diferentes temperaturas, analisando o comprimento e o peso das larvas durante o desenvolvimento.

2 OBJETIVOS

- Determinar como diferentes temperaturas afetam o crescimento dos imaturos de *Sarconesia chlorogaster* (Wied.);
- Ajustar um modelo para determinar a idade cronológica dessa espécie utilizando o peso e o comprimento das larvas durante o desenvolvimento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção e manutenção dos exemplares para estudo e a criação em laboratório foram descritas no Capítulo I.

3.1 Parâmetros biológicos

Para determinar o efeito da temperatura sobre o crescimento de *S. chlorogaster*, nesse capítulo foram abordados os seguintes parâmetros biológicos: peso e comprimento das larvas durante o desenvolvimento de *S. chlorogaster*.

Os experimentos foram realizados em seis temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35°C), todos utilizando a mesma metodologia, porém com indivíduos de gerações diferentes (F3, F4 e F5), provenientes da colônia estoque. Os experimentos foram feitos em temperaturas controladas, variando em um grau a mais ou a menos, $60 \pm 10\%$ de umidade e fotofase de 12 horas.

As mensurações do peso e do comprimento das larvas foram realizadas em períodos de tempo pré-determinados, concomitantemente aos experimentos descritos no Capítulo I. Para a temperatura de 10°C foram feitas amostragens a cada 24 horas e para 15°C a cada 12 horas, devido ao desenvolvimento mais lento nessas temperaturas. Para as demais temperaturas (20, 25, 30 e 35°C) as amostragens foram feitas a cada seis horas para as larvas de primeiro e segundo ínstar e a cada 12 horas para as larvas de terceiro ínstar. Em todas as temperaturas as amostragens foram realizadas até o abandono da dieta pelas larvas.

Para a obtenção do peso das larvas durante o desenvolvimento, em todas as amostragens foram retiradas aleatoriamente larvas de cada uma das réplicas, seguindo o seguinte critério: nas três primeiras observações foram retiradas 20 larvas por réplica, devido ao tamanho diminuto das mesmas, e a partir da quarta observação foram retiradas quatro larvas por réplica. A pesagem foi feita com os indivíduos ainda vivos e lavados anteriormente para retirada de resíduos do substrato no qual estavam sendo mantidos. Após a pesagem, no máximo quatro larvas por réplica foram sacrificadas em água fervente, por no mínimo 30 segundos, e acondicionadas em tubos do tipo *ependorf* contendo etanol 70%, para posterior mensuração do comprimento. Esse procedimento foi feito para todas as temperaturas analisadas.

As pesagens foram feitas em balança de precisão do Laboratório de Biologia Molecular “Danúncia Urban” do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. As larvas foram pesadas em grupos de 20 larvas (nas primeiras três amostragens) e quatro larvas (nas demais amostragens), sendo que o peso individual foi calculado dividindo o peso total pelo número de larvas pesadas.

O comprimento, considerado como a distância entre a cabeça e o último segmento abdominal da larva (Figura 1), foi medido no programa TPSDig 2.16 (Rohlf 2010) a partir de imagens obtidas das larvas que foram fixadas em etanol 70%. Para estimar o erro de medição no comprimento das larvas, três medições foram feitas em três dias diferentes para cada ínstar. Os resultados dessas medições foram comparados através de uma análise de variância de um fator ($P \leq 0,05$).



Figura 1. Eixo de medição do comprimento da larva de *S. chlorogaster*, baseado em Day & Wallman (2006).

3.2 Análises

Para cada temperatura foram testados vários modelos de crescimento baseados nas distribuições de Gompertz, von Bertalanffy, logístico e Weibull para descrever o crescimento dos imaturos de *S. chlorogaster*. O ajuste destes modelos foi feito no ambiente R (R Development Core Team 2011), sendo o melhor modelo escolhido pelo critério de Akaike (Johnson & Omland 2004), que determina o modelo mais explicativo com o menor número de parâmetros. Os valores dos parâmetros iniciais das regressões não lineares foram estimados por funções internas aos próprios modelos (*Self Structing functions*).

Para estimar o ganho de peso e aumento de comprimento durante o desenvolvimento larval foi calculada a diferença nos valores das variáveis (peso ou comprimento) das médias entre os ínstares subsequentes.

Para analisar se existia diferença no peso ou comprimento de *S. chlorogaster* entre as temperaturas, foi ajustado um modelo linear generalizado (GLM) utilizando uma distribuição de erro da família Gamma e uma função de ligação logarítmica. Os contrastes de Tukey ($P \leq 0,05$) foram utilizados para as comparações *a posteriori*. Estas análises foram realizadas para cada ístar separadamente utilizando o peso/comprimento como variável resposta e a temperatura como variável preditora. Para o GLM foram utilizadas as bibliotecas MASS (Venables & Ripley 2002) e effects (Fox 2003) e para a análise *a posteriori* foi utilizada a biblioteca multcomp (Hothorn *et al.* 2008).

4 RESULTADOS

4.1 Peso

A temperatura do ambiente influenciou no peso das larvas durante o desenvolvimento de *S. chlorogaster*. De maneira geral quanto maior a temperatura, mais rápido foi o ganho de peso das larvas.

As médias de peso das larvas de primeiro ínstar foram semelhantes em todas as temperaturas, exceto a de 10°C, na qual as larvas possuíram o menor peso. Já para as larvas de segundo ínstar, as médias de peso foram maiores nas temperaturas de 15°C e 20°C, sendo equivalente nas demais. No entanto, no terceiro ínstar a média de peso das larvas nas temperaturas de 15°C a 30°C foi semelhante (Tabela 1).

Apenas as temperaturas extremas afetaram o crescimento das larvas de *S. chlorogaster*. No desenvolvimento a 10°C as larvas tiveram um peso médio um pouco inferior aos encontrados nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C, assim como um menor ganho de peso (Figura 2). Em 35°C, o ganho de peso até o segundo ínstar foi semelhante ao das demais temperaturas, contudo no terceiro ínstar caiu pela metade. Isso resultou em uma média mais baixa de peso para esse ínstar, provavelmente causado pela alta temperatura.

Através do coeficiente de variação, pode-se verificar que há uma grande dispersão na média do peso das larvas entre os indivíduos do mesmo ínstar, principalmente entre o primeiro e segundo ínstar (Tabela 1).

Tabela 1. Média de peso (M) em gramas, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para os três ínstaes larvais de *Sarconesia chlorogaster*, criados a temperaturas entre 10°C e 35°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas. As letras representam os resultados do teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo que temperaturas sem diferença estatística na média de peso são representadas pelas mesmas letras.

T (°C)	Peso (g)								
	1º ínstar			2º ínstar			3º ínstar		
	M	DP	CV	M	DP	CV	M	DP	CV
10	0,00021a	0,00016	76,19	0,0035a	0,0024	68,57	0,056a	0,024	42,85
15	0,00027b	0,00027	100,00	0,0043b	0,0031	72,09	0,069b	0,030	43,47
20	0,00031b	0,00028	90,32	0,0053b	0,0031	58,49	0,067b	0,034	50,74
25	0,00027b	0,00018	66,66	0,0035a	0,0036	102,90	0,072b	0,033	45,83
30	0,00024ab	0,00019	79,16	0,0035a	0,0030	85,71	0,069b	0,038	55,07
35	0,00031b	0,00026	83,87	0,0036a	0,0025	69,44	0,036c	0,014	38,88

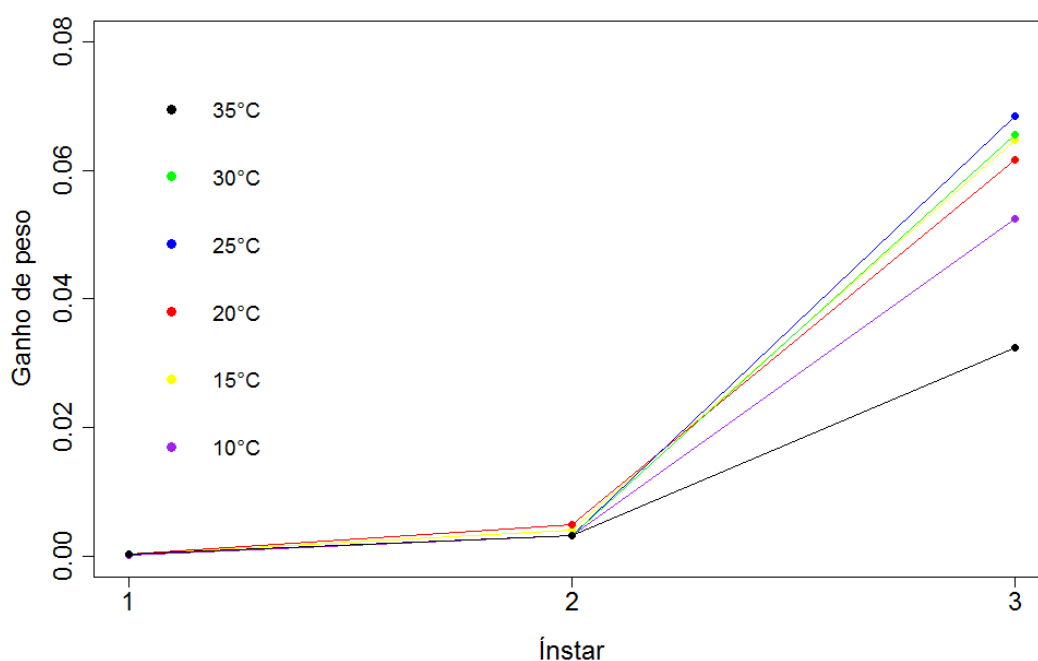


Figura 2. Ganho de peso (em gramas) nos três ínstaes larvais de *Sarconesia chlorogaster*, criados a temperaturas entre 10°C e 35°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas.

A análise dos modelos de crescimento (Gompertz, von Bertalanffy, logístico e Weibull) indicou que o modelo de Weibull foi o que melhor representa o crescimento de *Sarconesia chlorogaster*. Este modelo de crescimento descreveu o crescimento

com bons ajustes em todas as temperaturas observadas nesse estudo. De maneira geral, as curvas apresentam uma forma sigmóide, semelhantes entre as temperaturas, e podem ser divididas em três fases (Levot *et al.* 1979) (Figuras 3 e 4). Na fase inicial há um crescimento mais lento, com pouco ganho de peso, sendo que o tempo de duração dessa fase pode ser mais longo ou mais curto, dependendo da temperatura. Na segunda fase há um crescimento exponencial, com um ganho de peso rápido até atingir uma assíntota em que o peso das larvas fica praticamente estável (terceira fase ou fase estacionária). Este peso atingido na assíntota é mantido até o início da dispersão larval. Isso pode ser observado mesmo na temperatura de 35°C, apesar da assíntota estar bem abaixo das outras temperaturas (Figura 5).

Existem diferenças entre as temperaturas em relação à posição das curvas ao longo do eixo de tempo, a inclinação da fase exponencial e o valor máximo no qual o aumento de peso cessou. Pode-se notar que na temperatura de 10°C, por exemplo, o ganho de peso na segunda fase é mais gradual do que nas outras temperaturas (Figura 5). A essa temperatura as larvas demoraram mais tempo para chegar ao peso ideal para a dispersão, no final do terceiro ínstar.

O início do período de crescimento exponencial para a temperatura de 10°C foi aproximadamente 150 horas após a eclosão e a 15°C começou aproximadamente 50 horas após a eclosão. A 20°C esse crescimento exponencial iniciou-se após 35 horas e a 25, 30 e 35°C aproximadamente 20 horas após a eclosão. Assim como o período de crescimento exponencial, no geral, a fase estacionária também teve início cada vez mais rápido, conforme a temperatura se elevou: a 10°C teve início aproximadamente 400 horas após a eclosão, a 15°C a partir de 200 horas após a eclosão. A 20°C, 120 horas após a eclosão e a 25, 30 e 35°C em média, 70 horas após a eclosão.

As curvas de peso das larvas durante o desenvolvimento em cada temperatura estão representadas nas Figuras 3 e 4. Os parâmetros fornecidos pelo ajuste final do modelo podem ser usados para predições relacionando o tempo de desenvolvimento com o peso da larva. Assim, para cada temperatura foram geradas equações que podem ser usadas para prever a idade de uma larva coletada em um cadáver através do peso via predição inversa.

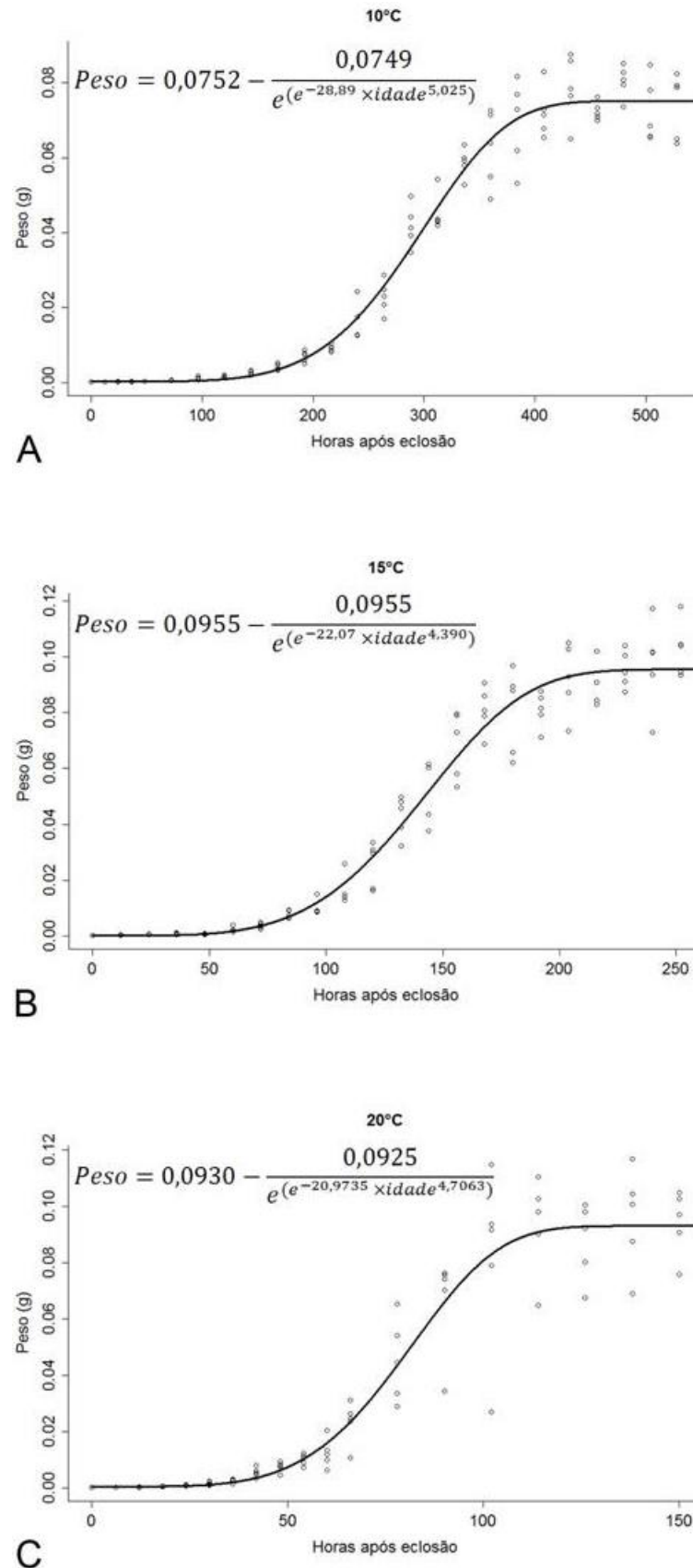


Figura 3. Curvas de crescimento do peso (g) das larvas de *Sarconesia chlorogaster* durante o desenvolvimento nas temperaturas de 10°C (a), 15°C (b) e 20°C (c), baseadas no modelo de crescimento de Weibull.

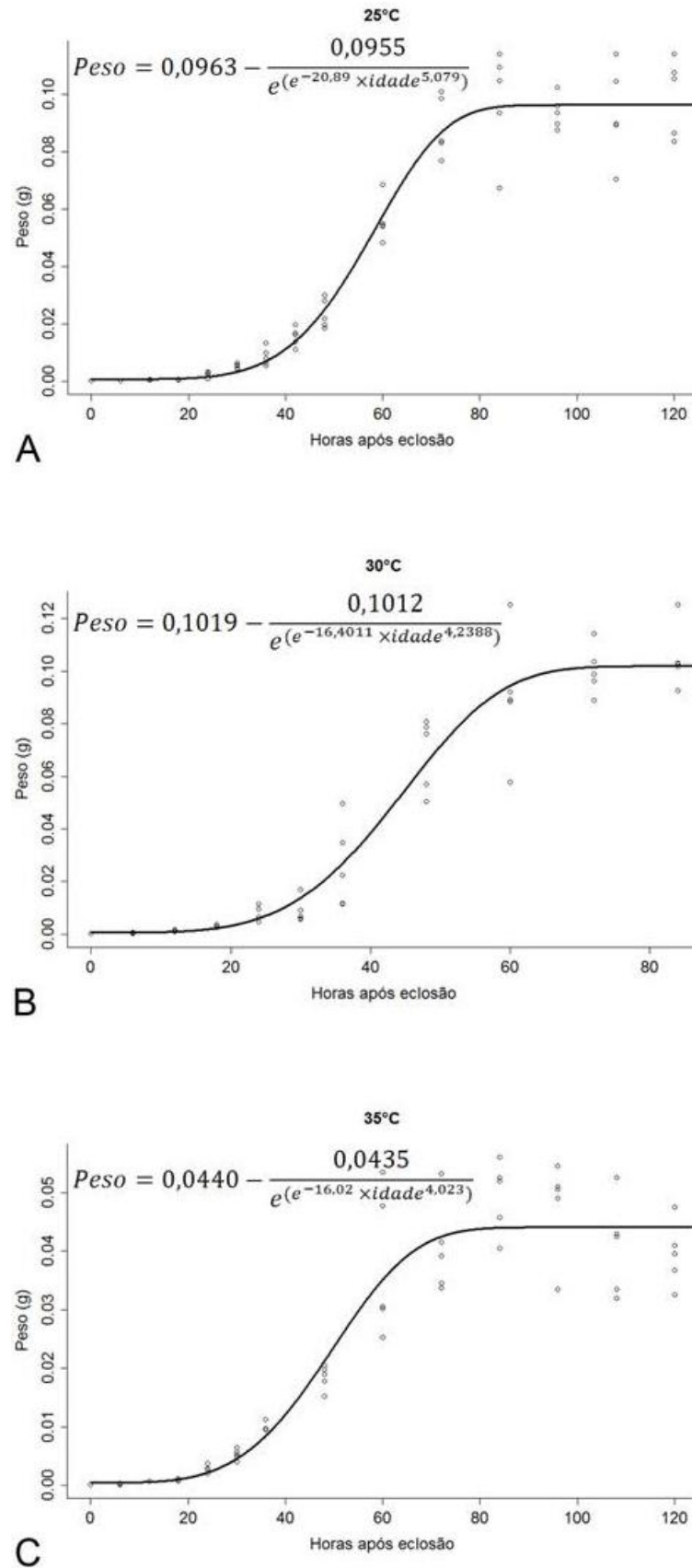


Figura 4. Curvas de crescimento do peso (g) das larvas de *Sarconesia chlorogaster* durante o desenvolvimento nas temperaturas de 25°C (a), 30°C (b) e 35°C (c), baseadas no modelo de crescimento de Weibull.

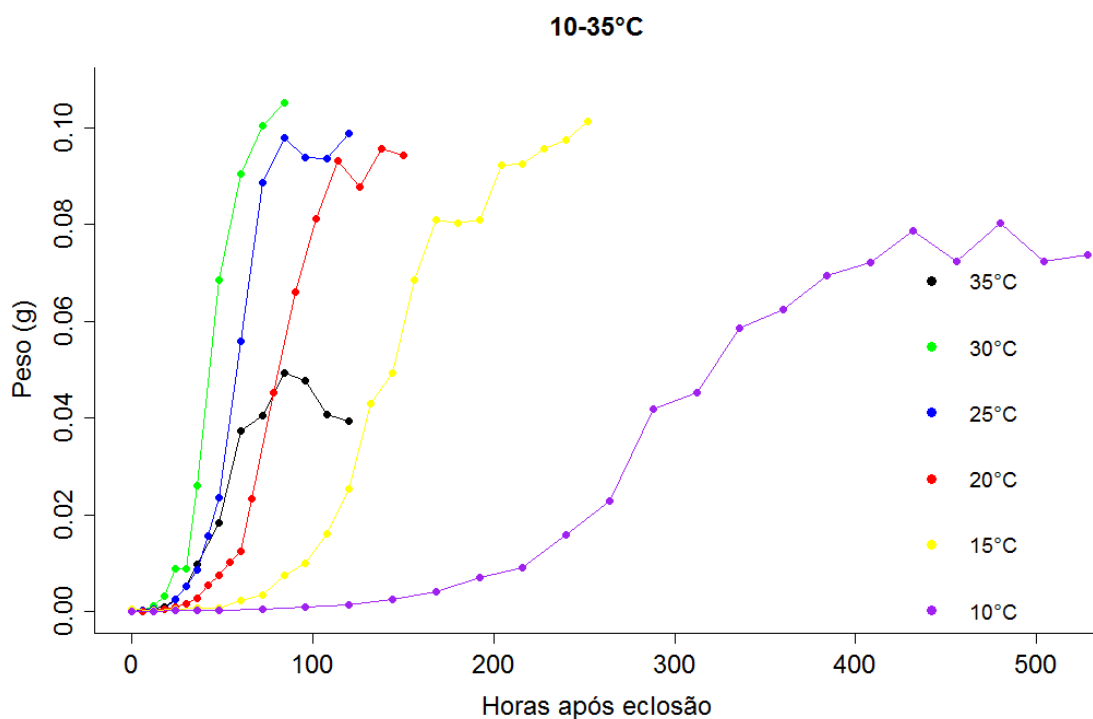


Figura 5. Média do peso (g) das larvas de *Sarconesia chlorogaster* durante o desenvolvimento em temperaturas de 10°C a 35°C.

4.2 Comprimento

Os resultados da estimativa de erro de medição no comprimento das larvas indicam que não houve diferença significativa nas medições entre os diferentes dias: primeiro ínstar ($F_{1,85}=0,022$, $P=0,8823$), segundo ínstar ($F_{1,88}=0,0045$, $P=0,9467$) e terceiro ínstar ($F_{1,88}=0,0241$, $P=0,877$) atestando o grau de acurácia da medições, portanto os dados foram agrupados.

Assim como ocorreu para o peso, a temperatura do ambiente também influenciou no crescimento das larvas durante o desenvolvimento de *S. chlorogaster*, medido através do comprimento das mesmas. De modo geral, quanto maior a temperatura, mais rápido foi o ganho no comprimento das larvas.

O crescimento das larvas de primeiro ínstar com base no comprimento foi menor nas temperaturas acima de 20°C, sendo que a 10°C as larvas possuíram o maior comprimento médio (Tabela 2). Já para o segundo e terceiro ínstares, os comprimentos médios nas temperaturas de 10°C a 30°C foram semelhantes. No segundo ínstar o maior comprimento foi observado a 10°C. O menor valor médio de

comprimento e menor ganho no crescimento foram observados na temperatura de 35°C, em todos os ínstaros (Tabela 2 e Figura 6).

As larvas no terceiro ínstar a 25°C foram as que apresentaram o maior valor médio e ganho de comprimento (Tabela 2 e Figura 6). Já as larvas de terceiro ínstar que se desenvolveram a 35°C ficaram com quase 2 mm a menos na média de comprimento se comparado às outras temperaturas. Esse fato também se deu provavelmente devido à alta temperatura, que prejudicou não só o peso médio final, observado anteriormente, mas também o comprimento das larvas nessa temperatura.

A comparação do ganho de comprimento entre as temperaturas está representada na Figura 6.

Assim como o peso, pode-se observar na Tabela 2 que há variação na média do comprimento das larvas entre os indivíduos do mesmo ínstar, e que essa foi praticamente constante entre os ínstaros (Tabela 2). Existe uma diminuição nos valores do coeficiente de variação apenas no terceiro ínstar, principalmente nas temperaturas de 10°C e 35°C.

Tabela 2. Média de comprimento (M) em milímetros, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para os três ínstaros larvais de *Sarconesia chlorogaster*, criados a temperaturas entre 10°C e 35°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas. As letras representam os resultados do teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo que temperaturas sem diferença estatística na média de comprimento são representadas pelas mesmas letras.

T (°C)	Comprimento (mm)								
	1º ínstar			2º ínstar			3º ínstar		
	M	DP	CV	M	DP	CV	M	DP	CV
10	2,35a	0,47	20,00	5,87a	1,55	26,40	14,34a	2,21	15,41
15	2,16ab	0,89	41,20	5,83a	1,55	26,58	14,78a	2,87	19,41
20	2,07b	0,60	28,98	5,54a	1,54	27,79	14,25a	3,43	24,07
25	2,04ab	0,55	26,96	5,60a	1,50	26,78	14,88a	3,30	22,17
30	1,94b	0,58	29,89	5,70a	1,14	20,00	14,11a	3,83	27,14
35	1,92b	0,62	32,29	4,75b	1,55	32,63	12,85b	2,14	16,65

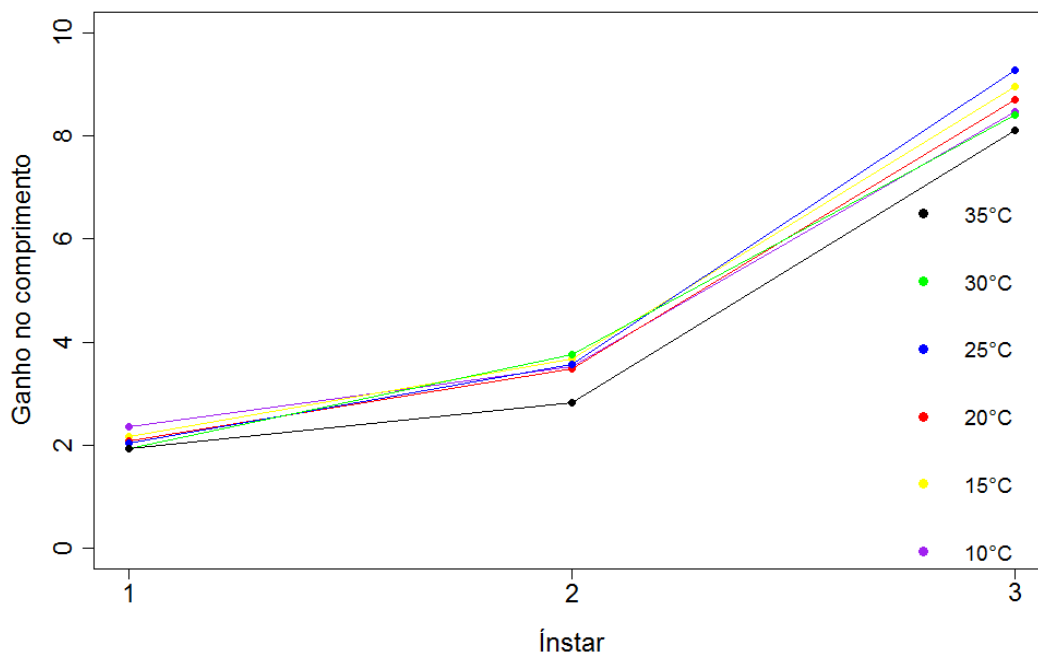


Figura 6. Ganho no comprimento (em milímetros) nos três ínstar larvais de *Sarconesia chlorogaster*, criados a temperaturas entre 10°C e 35°C, 60±10% UR e fotofase de 12 horas.

Novamente, assim como nas curvas de peso, a análise dos modelos de crescimento de Gompertz, von Bertalanffy, logístico e de Weibull indicou que o último foi o modelo que melhor representa o crescimento de *S. chlorogaster*, com bom ajuste em todas as temperaturas. As curvas são sigmóides e semelhantes de maneira geral (Figuras 7 e 8). As curvas de comprimento não têm uma fase inicial tão longa quanto às curvas de peso, sendo que a fase exponencial se inicia mais rapidamente. Essa segunda fase apresenta um crescimento exponencial com um aumento rápido no comprimento até atingir uma assíntota em que as larvas não aumentam mais de tamanho (terceira fase ou fase estacionária). O comprimento larval alcançado na assíntota é mantido até o início da dispersão larval. Este padrão também pode ser observado na temperatura de 35°C, mesmo com uma assíntota abaixo das demais temperaturas (Figura 9).

Assim como nas curvas de peso, aqui também são observadas diferenças entre as temperaturas em relação à posição das curvas ao longo do eixo de tempo, a inclinação da fase exponencial e o valor máximo no qual o aumento de comprimento cessou. A curva de comprimento das larvas a 10°C também é parecida

com a curva de peso nessa mesma temperatura, embora o crescimento não tenha sido tão rápido quanto nas outras temperaturas (Figura 9). A 10°C as larvas demoraram mais tempo para chegar ao comprimento ideal para a dispersão, ao final do terceiro ínstar, porém apresentaram o comprimento final próximo às demais, diferentemente do peso.

O início do período de crescimento exponencial para as curvas de comprimento é muito próximo à eclosão. O início do período da fase estacionária para 10°C foi de aproximadamente 350 horas após a eclosão, a 15°C essa fase teve início 180 horas após a eclosão, a 20°C 100 horas após a eclosão e a 25, 30 e 35°C, aproximadamente 70 horas após a eclosão.

As curvas de comprimento das larvas durante o desenvolvimento em cada temperatura estão representadas nas Figuras 7 e 8, juntamente com as fórmulas de ajuste do modelo, as quais podem ser utilizadas para realizar a predição inversa para esta medida. O gráfico com a comparação do comprimento entre as temperaturas está representado na Figura 9.

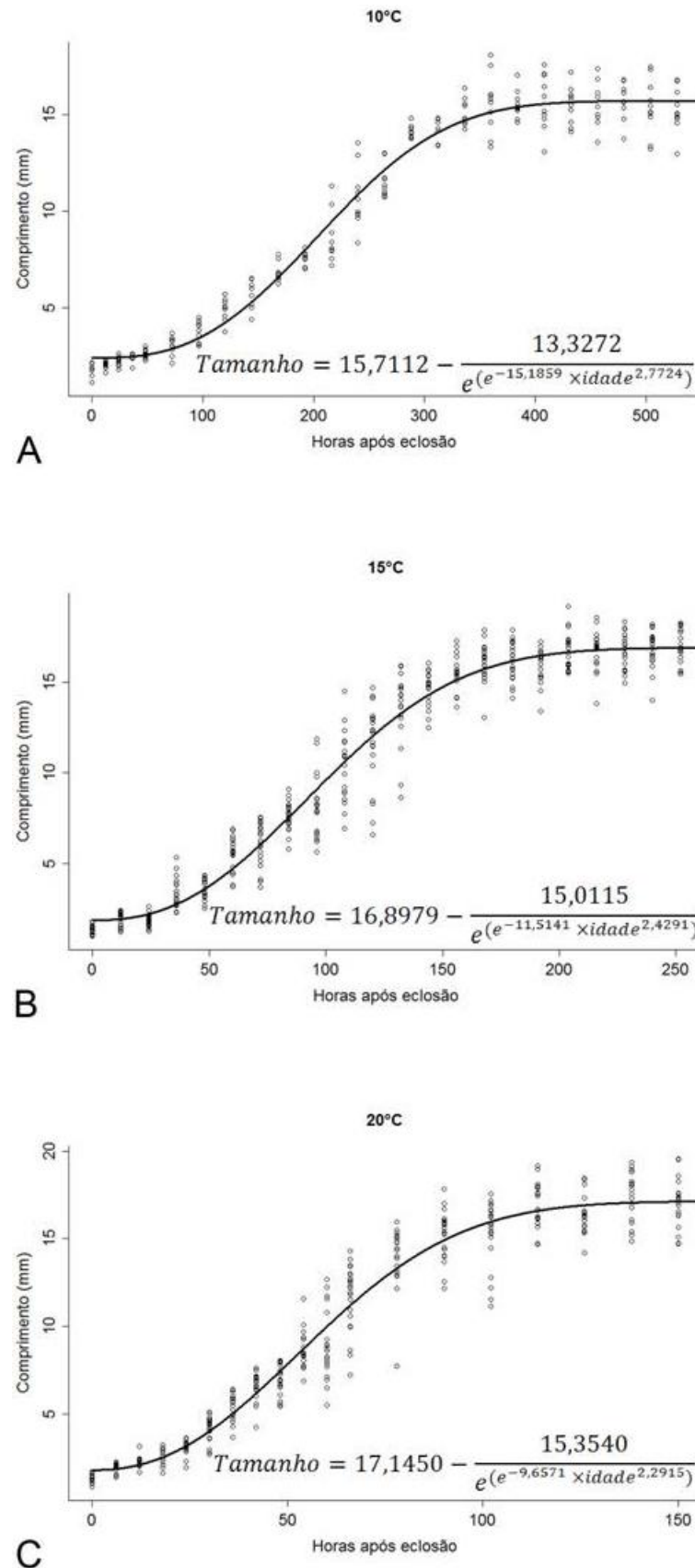


Figura 7. Curvas de crescimento do comprimento (mm) das larvas de *Sarconesia chlorogaster* durante o desenvolvimento nas temperaturas de 10°C (a), 15°C (b) e 20°C (c), baseadas no modelo de crescimento de Weibull.

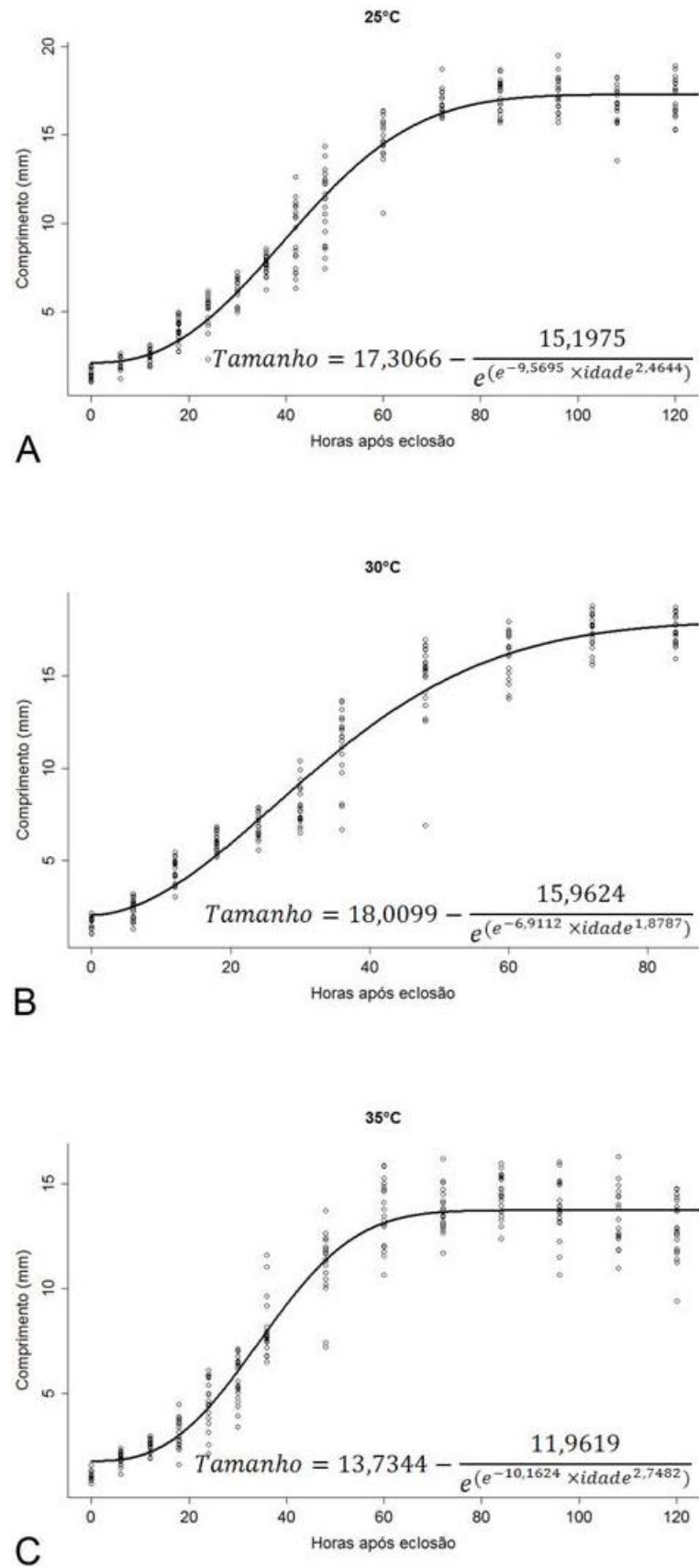


Figura 8. Curvas de crescimento do comprimento (mm) das larvas de *Sarconesia chlorogaster* durante o desenvolvimento nas temperaturas de 25°C (a), 30°C (b) e 35°C (c), baseadas no modelo de crescimento de Weibull.

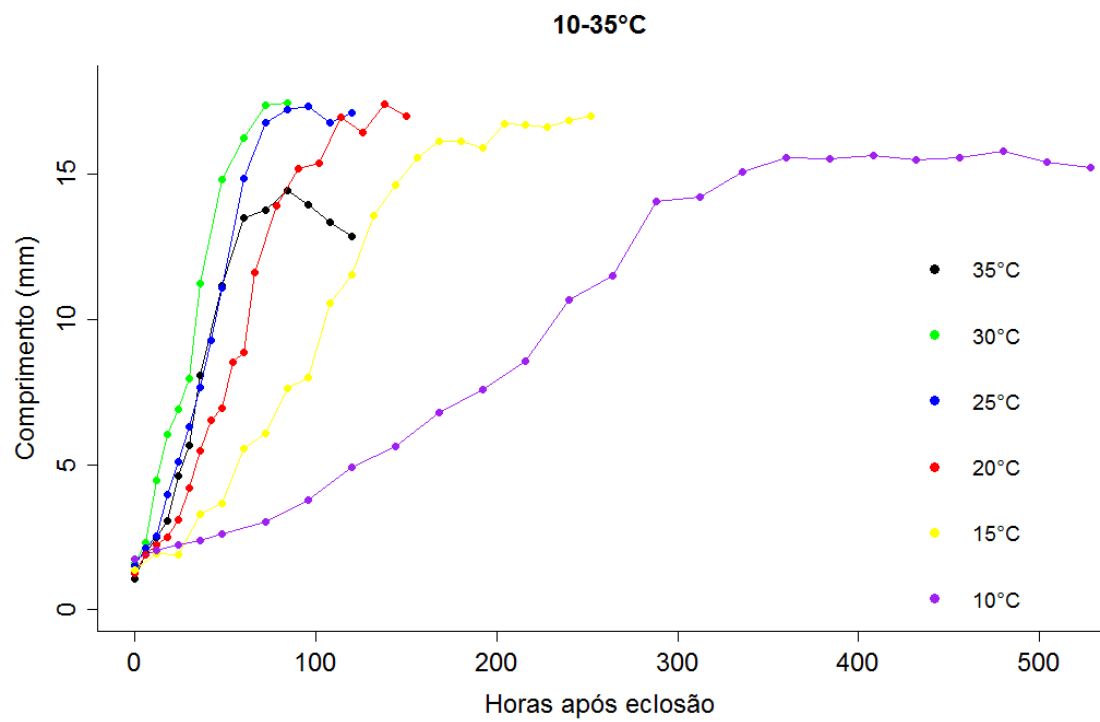


Figura 9. Média do comprimento (mm) das larvas de *Sarconesia chlorogaster* durante o desenvolvimento em temperaturas de 10°C a 35°C.

5 DISCUSSÃO

5.1 Utilização das medidas de peso e comprimento das larvas nas estimativas de intervalo pós-morte

Um dos pontos mais importantes e discutíveis para a utilização de medidas de peso e comprimento de moscas na estimativa de IPM é a confiabilidade do uso dessas medidas e boa parte desta discussão é causada devido às várias metodologias que são utilizadas na mensuração das larvas (Wells & Kurahashi 1994; Wells & LaMotte 1995; Greenberg & Kunich 2002; Day & Wallman 2006; Richards *et al.* 2008).

A medição do comprimento é o parâmetro mais comum para estimar a idade de uma larva (Day & Wallman 2006) e talvez por essa razão as metodologias para esse fim sejam mais discutidas na literatura do que aquelas que mensuram o peso. No entanto, o essencial é que, independente da metodologia utilizada, haja mais homogeneidade na observação de certos parâmetros que indiquem uma idade da larva coletada, diminuindo as variações inerentes nas estimativas do IPM.

Um procedimento considerado eficiente implicaria em sacrificar as larvas por imersão em água fervente por no mínimo 30 segundos (Tawani & Greenberg 1993; Adams & Hall 2003). Essa prática, além de garantir que todas as larvas sejam sacrificadas no mesmo momento e temperatura, faz com que sofram extensão máxima, que é comparável à extensão máxima de uma larva viva (Tawani & Greenberg 1993). No entanto, o protocolo ideal implica que as larvas sejam medidas imediatamente depois de sacrificadas, e somente depois preservadas em álcool 70% ou 80% (Tawani & Greenberg 1993; Adams & Hall 2003).

Apesar de ser uma metodologia simples, esse processo apresenta pontos negativos como a necessidade de medição rápida, o que geralmente não é possível em uma cena de crime. Além disso, grande parte dos peritos brasileiros não tem condições (devido ao grande número de afazeres) ou não estão treinados para fazer essas medições. Ou seja, o material demoraria ainda mais tempo até chegar à mão de um especialista que pudesse realizar as medidas, impossibilitando que as medições pudessem ser realizadas logo após as larvas serem sacrificadas.

Portanto, esse trabalho avaliou o comprimento após as larvas serem sacrificadas em água fervente e preservadas em álcool 70%, pois é o que normalmente ocorreria em um caso real. Além disso, o comprimento com as larvas

recém mortas só pode ser medido uma vez (Adams & Hall 2003). Após as larvas serem preservadas, diferenças no comprimento irão ocorrer e se houver qualquer dúvida na mensuração do comprimento, após a preservação a medição sempre será diferente.

Outra possível fonte de erro nas medições vem do formato que as larvas podem ficar após o processo de fixação. O fenômeno conhecido como “head-curling” – definido como a inclinação da cabeça de uma larva para a superfície ventral do corpo como consequência da metodologia de morte e preservação das larvas (Day & Wallman 2006) - poderia ser um problema para estimar a idade de larvas ao utilizar-se o comprimento do corpo. No entanto, esse fenômeno foi observado somente em cinco dentre aproximadamente 1800 larvas medidas nesse trabalho, não sendo, portanto, uma fonte de variação bem como uma complicação para a utilização desse tipo de dado.

Com relação ao peso, não há muitas discussões sobre as metodologias utilizadas para a determinação dessas medidas, mas elas podem ser feitas de duas maneiras: peso seco e peso úmido. O peso seco é menos afetado pelo fluido conservante (como o álcool) que o comprimento do corpo e, portanto pode ser útil em situações em que a larva não foi preparada adequadamente para medições de comprimento (Wells & Kurahashi 1994). Porém, o peso seco envolve amostragem destrutiva (Wells & LaMotte 1995) e isso é um ponto negativo para a entomologia forense. Muitas vezes, não se consegue identificar as larvas até nível específico, sendo necessária a criação da larva até a forma adulta para confirmar essa identificação. Para ter as medidas de peso seco, é necessário que as larvas passem por processos que ocasionam sua morte, impossibilitando sua criação. Considerando estes fatores, o presente trabalho estima o peso úmido das larvas vivas, possibilitando que sejam retiradas as medidas de peso e que haja a criação das larvas para posterior identificação da espécie.

Embora as estimativas de peso possam ser feitas com larvas vivas, as limitações de qualquer procedimento para distinguir a idade da larva a partir de seu peso são, fundamentalmente, devidas à sobreposição de pesos em idades diferentes (Wells & LaMotte 1995). Essa grande variação nos pesos dentro e entre as idades foi encontrada para *S. chlorogaster*, e pode ser um fator causador de erro para as estimativas de IPM. Porém, é importante ressaltar que, quando possível, deve ser utilizada mais de uma metodologia para se estimar o IPM, inclusive

comparando os resultados obtidos entre essas metodologias, visando sempre a aumentar a acurácia e a confiabilidade de uma dada estimativa.

Se uma das fontes de variação para estimar o IPM através do comprimento e peso é o modo de preservação e medição das larvas, a utilização global desse método dependeria do desenvolvimento de um protocolo único para todo o país, para que todos os trabalhos e resultados obtidos pudessem ser utilizáveis e comparáveis.

5.2 Peso e comprimento das larvas durante o desenvolvimento

Para sobreviver, é necessário que as larvas de terceiro ínstar alcancem um peso crítico antes da pupariação. Este peso crítico foi calculado para quatro espécies de califorídeos (Ribeiro e Von Zuben 2010) e no geral variou de 30 a 35 mg. Na maior temperatura utilizada, 35°C, *S. chlorogaster* atingiu um peso médio de 36 mg, porém não conseguiu emergir, sendo que o menor valor de uma larva que emergiu foi de 65 mg a 10°C. Portanto, pode-se sugerir que o peso crítico para pupariação de *S. chlorogaster* seja maior que o das espécies estudadas por Ribeiro e Von Zuben (2010). Considerando que o peso final das larvas é afetado pelas condições da temperatura durante o desenvolvimento (Moed *et al.* 1999), conclui-se que a obtenção de uma média final baixa de peso pelas larvas provavelmente foi causada pela alta temperatura durante todo o desenvolvimento larval.

Existe um crescimento compensatório das larvas entre as temperaturas e os efeitos dependem do ínstar, com exceção dos casos extremos. As larvas de *S. chlorogaster* quase não alteraram o ganho de peso em função da temperatura. Na tentativa de atingir o potencial fisiológico máximo, os insetos apresentaram uma resposta compensatória, prolongando a duração da fase larval (Busato *et al.* 2004), dependendo da temperatura.

O coeficiente de variação do peso médio das larvas de *S. chlorogaster* apresentou valores muito altos. Mas é importante ressaltar que as larvas crescem continuamente, mesmo estando no mesmo ínstar e que esse valor calculado é uma média para todo o estágio de desenvolvimento. Portanto, esse coeficiente de variação abrange a variação desde o início até o final de cada ínstar, e esse intervalo de tempo pode durar de horas a dias. Se a média de cada ínstar for utilizada como base de dados para as estimativas de IPM, pode retirar a precisão da

estimativa, devido a grande variação. Por isso, é importante utilizar os modelos que relacionam tais variáveis à idade para fazer a predição inversa, diminuindo assim o erro causado pela imprecisão nos valores médios. O mesmo acontece com o coeficiente de variação do comprimento das larvas, que apesar de não apresentar valores tão altos quanto os de peso, também variaram consideravelmente.

As curvas de crescimento (tanto de peso quanto de comprimento) em formato sigmóide obtidas nesse estudo são típicas do desenvolvimento larval dos califorídeos, e refletem o fato de que as larvas, principalmente as de terceiro ínstar, crescem rapidamente no início e depois deixam de se alimentar (Greenberg 1991; Donovan *et al.* 2006). Esse crescimento rápido das larvas de terceiro ínstar é verificado principalmente no gráfico de ganho de peso entre os ínstaes de *S. chlorogaster*, mas também em menor grau no ganho de comprimento. Outros estudos já obtiveram gráficos e curvas de crescimento sigmóides semelhantes aos de *Sarconesia chlorogaster* (Levot *et al.* 1979; Wells & Kurahashi 1994; Day e Wallman 2006).

A resposta dos animais ectotérmicos ao aumento da temperatura tem sido bastante estudada, tanto para aplicações na agricultura (Busato *et al.* 2004) e entomologia forense (Hwang & Turner 2005), por exemplo, quanto pelas relações entre história de vida e evolução dos grupos (Kingsolver & Huey 2008). Especificamente para Calliphoridae, existe uma relação entre a temperatura de criação e o peso e comprimento das larvas durante o desenvolvimento (Boatright & Tomberlin 2010).

O comprimento das larvas de califorídeos pode chegar de 2,5 a 4 mm no primeiro ínstar, 8 mm no segundo ínstar e de 15 a 22 mm no terceiro ínstar (Greenberg & Kunich 2002). Nesse estudo, *S. chlorogaster* atingiu médias de comprimento um pouco inferiores que as citadas anteriormente, em todas as temperaturas.

No entanto, as larvas de algumas espécies atingiram maiores valores médios de comprimento em temperaturas mais altas (Richards *et al.* 2008, 2009) ao passo que outras tiveram o padrão inverso (Donovan *et al.* 2006), como ocorreu com *Sarconesia chlorogaster*. Ambas as possibilidades ocorrem nos insetos de maneira geral (Atkinson 1994) sendo que a diminuição do tamanho em relação ao aumento da temperatura pode ser gerada pelo aumento na taxa metabólica em relação à taxa de crescimento mediada por interações hormonais (Dawidowitz & Nijhout 2004;

Kingsolver & Huey 2008). O principal efeito da elevação de temperatura é um aumento tanto da taxa metabólica quanto das necessidades metabólicas. O peso corporal final, então, depende do grau em que essas necessidades metabólicas podem ser cumpridas pelo consumo real de alimentos (Büns & Ratte 1991). Considerando que *S. chlorogaster* é uma espécie típica de ambientes com temperaturas mais baixas, é possível que a taxa de crescimento em temperaturas maiores do que 30°C seja tão rápida que diminua a eficiência de conversão dos alimentos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, Z. J. O. & M. J. R. Hall. 2003. Methods used for the killing and preservation of blowfly larvae, and their effect on post-mortem larval length. **Forensic Science International** **138**: 50-61.
- Atkinson, D. 1994. Temperature and organism size – a biological law of ectotherms? **Advances in Ecological Research** **25**: 1-58.
- Boatright, S. A. & J. K. Tomberlin. 2010. Effects of Temperature and Tissue Type on the Development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology** **47**: 917-923.
- Büns, M. & H. T. Ratte. 1991. The combined effects of temperature and food consumption on body weight, egg production and developmental time in *Chaoborus crystallinus* De Geer (Diptera: Chaoboridae). **Oecologia** **88**: 470-476.
- Busato, G. R., A. D. Grützmacher, M. S. Garcia, F. P. Giolo & S. D. Nörnberg. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia** **28**: 1278-1283.
- Carvalho, C. J. B. de & C. A. de Mello-Patiu. 2008. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia** **52**: 390-406.
- Catts, E. P. & N. H. Haskell. 1990. **Entomology & Death: A Procedural Guide**. Joyce's Print Shop, Clemson, xii+182p.
- Clark, K., L. Evans & R. Wall. 2006. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. **Forensic Science International** **156**: 145-149.
- Davidowitz, G. & H. F. Nijhout. 2004. The Physiological Basis of Reaction Norms: The Interaction Among Growth Rate, the Duration of Growth and Body Size. **Integrative and Comparative Biology** **44**: 443-449.

- Davies, L. & G. G. Ratcliffe. 1994. Rate of developments of some pre-adult stages in blowflies with reference to low temperatures. **Medical and Veterinary Entomology 8**: 245-254.
- Day, D. M. & J. F. Wallman. 2006. Width as an alternative measurement to length for post-mortem interval estimations using *Calliphora augur* (Diptera: Calliphoridae) larvae. **Forensic Science International 159**: 158-167.
- Donovan, S. E., M. J. R. Hall., B. D. Turner & C. B. Moncrieff. 2006. Larval growth rates of the blowfly, *Calliphora vicina*, over a range of temperatures. **Medical and Veterinary Entomology 20**: 106-114.
- Estrada, D. A., M. D. Grella, P. J. Thyssen & A. X. Linhares. 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya abiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. **Neotropical Entomology 38**: 203-207.
- Fox, J. 2003. Effect Displays in R for Generalised Linear Models. **Journal of Statistical Software 8**: 1-27. <http://www.jstatsoft.org/v08/i15/>.
- Grassberger, M. & C. Reiter. 2001. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. **Forensic Science International 120**: 32-36.
- Greenberg, B. 1991. Flies as Forensic Indicators. **Journal of Medical Entomology 28**: 565-577.
- Greenberg, B & J. C. Kunich. 2002. **Entomology and the Law: Flies as Forensic Indicators**. Cambridge University Press, Cambridge, xiii+330p.
- Hothorn, T., F. Bretz & P. Westfall. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. **Biometrical Journal 50**: 346-363.
- Hwang, C. & B. D. Turner. 2005. Spatial and temporal variability of necrophagous *Diptera* from urban to rural areas. **Medical and Veterinary Entomology 19**: 379-391.

- Johnson, J. & K. Omland. 2004. Model selection in ecology and evolution. **Trends in Ecology and Evolution** **19**: 101-108.
- Kingsolver, J. G. & R. B. Huey. 2008. Size, temperature, and fitness: three rules. **Evolutionary Ecology Research** **10**: 251-268.
- Levot, G. W., K. R. Brown & E. Shipp. 1979. Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. **Bulletin of Entomological Research** **69**: 469-475.
- Moed, G. H. de, C. L. J. J. Kuitwagen, G. de Jong & W. Scharloo. 1999. Critical weight for the induction of pupariation in *Drosophila melanogaster*: genetic and environmental variation. **Journal of Evolutionary Biology** **12**: 852-858.
- Niederegger, S., J. Pastuschek & G. Mall. 2010. Preliminary studies of the influence of fluctuating temperatures on the development of various forensically relevant flies. **Forensic Science International** **199**: 72-78.
- Nishida, K. 1984. Experimental studies on the Estimation of Postmortem Intervals by Means of Fly Larvae Infesting Human Cadavers. **Japanese Journal of Legal Medicine** **38**: 24-41.
- R Development Core Team 2011. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Ribeiro, C. da S. & C. J. Von Zuben. 2010. Nutritional ecology of blowflies (Diptera, Calliphoridae): estimates of critical larval weight for pupation on two different diets. **Revista Brasileira de Entomologia** **54**: 661-664.
- Richards, C. S., I. D. Paterson & M. H. Villet. 2008. Estimating the age of immature *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), correcting for temperature and geographical latitude. **International Journal of Legal Medicine** **122**: 271-279.
- Richards, C. S., K. L. Crous & M. H. Villet. 2009. Models of development for blowfly sister species *Chrysomya chloropyga* and *Chrysomya putoria*. **Medical and Veterinary Entomology** **23**: 56-61.

- Rohlf, F. J. 2010. **tpsDig, digitize landmarks and outlines**, version 2.16. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Tawani, T. I. & B. Greenberg. The Effect of Killing and Preservative Solutions on Estimates of Maggot Age in Forensic Cases. **Journal of Forensic Sciences** **38**: 702-707.
- Thyssen, P. J. 2005. **Caracterização das formas imaturas e determinação das exigências térmicas de duas espécies de califorídeos (Diptera) de importância forense**. Tese (Doutorado em Parasitologia). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 116p.
- Vélez, M. C. & M. Wolff. 2008. Rearing five species of Diptera (Calliphoridae) of forensic importance in Colombia in semicontrolled field conditions. **Papéis Avulsos de Zoologia** **48**: 41-47.
- Venables, W. N. & B. D. Ripley. 2002. **Modern Applied Statistics with S**. 4th ed. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0.
- Wells, J. D. & H. Kurahashi. 1994. *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) development: Rate, variation and the implications for forensic entomology. **Japanese Journal of Sanitary Zoology** **45**: 303-309.
- Wells, J. D. & L. R. LaMotte. 1995. Estimating Maggot Age from Weight Using Inverse Prediction. **Journal of Forensic Sciences** **40**: 585-590.

CONCLUSÕES

- O tempo de desenvolvimento de *Sarconesia chlorogaster* diminui conforme o aumento da temperatura, exceto em 35°C na qual a duração de todas as etapas de desenvolvimento observadas foram estatisticamente iguais a alguma outra temperatura;
- Em 35°C houve má formação e mortalidade de 100% das pupas, não permitindo que *S. chlorogaster* completasse seu desenvolvimento nessa temperatura;
- O peso e o comprimento das larvas no final do desenvolvimento foram muito parecidos entre as temperaturas observadas, com exceção do desenvolvimento a 35°C na qual as larvas apresentaram médias de peso e comprimento finais bem menores do que nas demais temperaturas;
- É possível utilizar os dados do tempo de desenvolvimento de *S. chlorogaster* deste trabalho em outras regiões que não tenham dados da biologia disponíveis, dentro das condições de temperatura estabelecidas;
- A temperatura base calculada para *S. chlorogaster* foi diferente da sugerida para as espécies da região tropical, sendo mais parecida com a utilizada para as espécies de regiões temperadas. Portanto, sugere-se que a temperatura base deve ser calculada para cada espécie, devendo ser evitada a utilização de “temperaturas base generalizadas”.
- Da mesma forma, para a maioria das espécies, o limite superior de desenvolvimento é ignorado na estimativa do IPM. Porém como para *S. chlorogaster* o limite superior é entre 30°C e 31°C, esse limite deve ser levado em conta, pois mesmo no sul do Brasil essa temperatura é atingida em algumas épocas do ano;
- Os dados de comprimento e peso das larvas de *S. chlorogaster* podem ser utilizados na estimativa do IPM, desde que a mesma metodologia de preservação e medição seja utilizada, para que os resultados obtidos possam ser comparáveis.